

# **Charakterisierung der Ligandenbindungs-Funktion für das Tumorsuppressorprotein Profilin I**

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades einer  
Doktorin der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)  
genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Stefania Rosan  
aus Treviso (Italien)

1. Referentin: Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch

2. Referent: Prof. Dr. Jürgen Wehland

eingereicht am: 11.07.2007

mündliche Prüfung (Disputation) am: 16. 10.2007

Druckjahr 2007

## **Vorveröffentlichungen der Dissertation**

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

### **Tagungsbeiträge**

Rosan, S., Jockusch, B.M., Rothkegel, M.: Analysis of the cellular function of profilin isoforms. European Cytoskeleton Forum, Gosau (Österreich), 13.-18. September 2003

Rosan, S., Jockusch, B.M., Rothkegel, M.: Characterisation of the tumor suppressor activity of profilin. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Heidelberg, 16.-19. März 2005

Rosan, S., Siemon, M., Jockusch, B.M., Rothkegel, M.: Mutational analysis of the tumor suppressor activity of profilin 1. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Braunschweig, 29. März-1. April 2006





*Für Robert, Walter und Dorotea*

## Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungen</b>	<b>V</b>
<b>Zusammenfassung</b>	<b>VIII</b>
<b>I        Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1        Profilin</b>	<b>1</b>
1.1      Liganden der Aktin-Bindungsdomäne von Profilin	3
1.2      Interaktion von Profilin mit sauren Phospholipiden	6
1.3      Wechselwirkung von Profilin mit Poly-L-Prolin-Liganden	7
<b>2        Die zelluläre Funktion von Profilin I</b>	<b>8</b>
<b>3        Die Rolle von Profilin I als Tumorsuppressor-Protein</b>	<b>11</b>
<b>4        Ziel der Arbeit</b>	<b>13</b>
<b>II       Material und Methoden</b>	<b>14</b>
<b>1        Material</b>	<b>14</b>
1.1      Geräte	14
1.2      Chemikalien und Enzyme	15
1.3      Medien	15
1.4      Bakterienstämme	15
1.5      Zelllinien	16
1.6      Vektoren	16
1.7      Oligodesoxynukleotide	16
1.8      Antikörper	18
<b>2        Methoden</b>	<b>19</b>
<b>2.1     Mikrobiologische Methoden</b>	<b>19</b>
2.1.1    Anzucht von Bakterien ( <i>E. coli</i> )	19
2.1.2    Lagerung von Bakterien	19

<b>2.2</b>	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>19</b>
2.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation	19
2.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	20
2.2.3	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien	20
2.2.4	Plasmid-Midi-Präparation	21
2.2.5	DNA-Konzentrationsbestimmung	21
2.2.6	DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen	21
2.2.7	Ligation	22
2.2.8	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.2.9	DNA-Fragmentisolierung	23
2.2.10	Polymerasekettenreaktion (PCR)	23
2.2.11	DNA-Sequenzierung	23
<b>3</b>	<b>Biochemische Methoden</b>	<b>24</b>
3.1	Expression und Aufreinigung von rekombinantem Profilin I	24
3.2	Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford (1976)	25
3.3	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	26
3.4	Nachweis von Proteinen im Immunblot	27
<b>4</b>	<b>Zellbiologische Methoden</b>	<b>29</b>
4.1	Kultivierung von Zellen	29
4.2	Passagieren von Zellen	29
4.3	Kryokonservierung von Zellen	30
4.4	Auftauen von kryokonservierten Zellen	30
4.5	Stabile Transformation von Zellen	30
4.6	Klonierung eukaryotischer Zellen	31
4.7	Protein „knock down“ mittels RNA-Interferenz	31
4.8	Herstellung von Zellextrakten	32
4.9	Fluoreszenzmikroskopie	32
4.10	„TUNEL apoptosis assay“	34
4.11	Adhäsion und „spreading“ von Zellen	34
4.12	„Wounding assay“	35
4.13	Bestimmung der Proliferationsrate	35
4.14	Verankerungsunabhängiges Wachstum von Zellen	36

4.15	Differenzierung von Zellen auf Matrigel™	37
<b>III</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
<b>1</b>	<b>„Knock down“ von Profilin I in CAL51-Zellen</b>	<b>38</b>
<b>2</b>	<b>Generierung von stabil transformierten CAL51-Zellderivaten</b>	<b>45</b>
2.1	Quantifizierung des Profilin I-Gehaltes in den stabilen Zellklonen	47
2.2	Analyse der Morphologie der CAL51-Zellklone	50
2.3	Untersuchung der Proliferationsrate der CAL51-Zellklone	51
<b>3</b>	<b>Analyse des Profilin I-Expressionspiegels der Zellklone nach RNAi-Behandlung</b>	<b>54</b>
<b>4</b>	<b>Untersuchung des Einflusses der Interaktion von PFNI mit Phospholipiden</b>	<b>60</b>
4.1	Vergleichende Analyse der Organisation des Mikrofilamentsystems	60
4.2	Analyse des Einflusses der PIP <sub>2</sub> -Bindung auf die Koloniebildung in Softagar	64
4.3	Analyse des Absetz- und Ausbreitungsrate	66
4.4	Analyse der Zellmigration	71
4.5	Differenzierung auf Matrigel™	73
<b>IV</b>	<b>Diskussion</b>	<b>75</b>
1	RNAi-Technologie als Methode zur Analyse des Cytoskeletts in Tumorzellen	75
2	In CAL51-Zellen hat Profilin I eine sehr kurze Halbwertszeit	76
3	Das Absenken des Profilinsspiegels in CAL51-Zellen führt zu Apoptose und verändertem Cytoskelett	77
4	Das Anheben des endogenen Profilinsspiegels in CAL51-Zellen durch Mutanten kann das Zellwachstum normalisieren	77
5	Der Effekt der RNAi-Behandlung auf die CAL51-Zellderivate ist abhängig von der Profilinmutante	79
6	Nach RNAi-Behandlung steigt der rekombinante PFNI-Gehalt	80
7	PFNI/LD beeinflusst Adhäsion und Migration von CAL51-Zellklonen	82
8	Die Bedeutung der Interaktion von Profilin mit PIP <sub>2</sub>	83

9	Ausblick	85
<b>V</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>86</b>
	<b>Danksagung</b>	
	<b>Lebenslauf</b>	

**Abkürzungen**

Å	Angström
Abb.	Abbildung
AD	“actin deficient”
ADP	Adenosindiphosphat
Arp	“actin related protein“
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BiPro	Birkenprofilin
bp	(engl.) Basenpaare
BSA	(engl.) Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
cm, mm, µm, nm	Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
C-Terminus	Carboxy-Terminus
cDNA	complementary-Desoxyribonukleinsäure
DAG	Diacylglycerol
DAPI	4,6-Diamino-2-Phenylindol
DMEM	“Dulbecco’s Modified Eagle Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTE	Dithioerythritol
ECL	“enhanced chemoluminescence”
<i>E.Coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EH	Eigene Herstellung
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	(engl.) Fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat

g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
G-Aktin	globuläres Aktin
GFP	“green fluorescent protein”
h, min, s	Stunde, Minute, Sekunde
HRP	(engl.) Meerretichperoxidase
HS	(engl.) Pferdeserum
IB	Immunblot
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
IP <sub>3</sub>	Inositol-1,4,5-Trisphosphat
IPTG	Isopropylthiogalaktosid
kDa	Kilodalton
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LD	“lipid deficient“
M, mM, µM, nM	molar, millimolar, mikromolar, nanomolar
mA	Milliampere
mmol, µmol, pmol	Millimol, Mikromol, picomol
mRNA	“messenger“-Ribonukleinsäure
miRNA	“micro“ RNA
MQ	Milli Q-Wasser
nt	(engl.) Nukleotid
N-Terminus	Amino-Terminus
OD	optische Dichte
PAA	Polyacrilamid
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	(engl.) Polymerase-Kettenreaktion
PFNI	Profilin I
pI	Isoelektrischer Punkt
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-Diphosphat
PKC	Proteinkinase C

RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RNase	Ribonuklease
rpm	“rounds per minute“
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Real Time PCR
SD	(engl.) Standardabweichung
SDS	(engl.) Natrium-Dodecylsulfat
siRNA	“short interfering” RNA
SMN	“survival of motor neuron”
Tab.	Tabelle
TBE	TRIS-Borat-EDTA
TBS-T	Tris-gepufferte Salzlösung mit Tween-Zusatz
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
TRITC	Tetramethyl-Rhodaminisothiocyanat
ü.N.	über Nacht
U	(engl.) Enzymeinheit
UV	Ultraviolettes Licht
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
VASP	“vasodilator stimulated phosphoprotein”
W	Watt
WT	Wildtyp
w/v	Gewicht pro Volumen



## Zusammenfassung

Profilin I ist ein 12 bis 16 kDa großes, ubiquitär exprimiertes, essentielles Protein. Mehrere Profilin-Isoformen sind bislang identifiziert worden und sind durch drei charakteristische Eigenschaften gekennzeichnet: Sie binden an G-Aktin, interagieren mit Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) und mit Proteinen, die Poly-L-Prolin-Motive enthalten. Aufgrund ihrer Interaktion mit Aktin besitzen Profiline eine polymerisationsfördernde Funktion und wirken damit regulierend auf die Aktindynamik der Zellen. Durch die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> sind Profiline auch direkt in Signaltransduktionswege, die zur Reorganisation des Mikrofilamentsystems führen, eingebunden. Profilin I ist an verschiedenen zellulären Prozessen beteiligt, jedoch ist seine genaue Funktion nicht vollständig aufgeklärt.

Ferner wirkt Profilin I als Tumorsuppressor in Brustkrebszellen, welche durch einen reduzierten Profilinhalt charakterisiert sind. Die Restauration des Profilinspiegels in der Brustkrebszelllinie CAL51 führt zur Suppression der Tumorigenizität, wobei die Bindung an Aktin essentiell für diese Funktion ist.

In Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss der Bindung von Profilinliganden bezüglich der Organisation des Mikrofilamentsystems und der Migration der Zellen untersucht. Zunächst wurde der Profilinhalt in CAL51-Zellen mittels RNAi reduziert. Der „knock down“ von Profilin I induziert in den Zellen Apoptose. Weiterhin wurden stabile Zellklone generiert, die Wildtyp-Profilin, eine Aktinbindungsmutante bzw. eine PIP<sub>2</sub>-Bindungsmutante des Profilin I (PFNI/LD) exprimieren. Die mRNA dieser rekombinanten Profiline waren resistent gegenüber der RNAi-Behandlung. Dieses zelluläre System ermöglichte die Untersuchung der Ligandenbindungseigenschaften ohne endogenen Profilin-Hintergrund. Die RNAi-Versuche bestätigten, dass die Bindung an Aktin essentiell für das Überleben von Brustepithelzellen ist, da die Zellen, die ausschließlich dieses mutierte Profilin exprimieren, sterben. Hingegen beeinflusste die Expression von PFNI/LD nicht die Vitalität der Zellen. Immunfluoreszenzstudien zeigten, dass die Zellen, die PFNI/LD exprimieren, im Vergleich zu Kontroll-Zellen weniger und diffusere Stressfasern, aber ausgeprägtere Adhäsionsgürtel besaßen. Außerdem wurde eine verminderte Fähigkeit zur Koloniebildung in Weichagar beobachtet. Weitere Untersuchungen zeigten hinzu eine gesteigerte Adhäsions- und Ausbreitungsrate der Zellen und wiesen eine erhöhte Migrationsrate auf. Die Fähigkeit der Zellen, auf Matrigel™ zu differenzieren, wurde jedoch nicht beeinflusst.

Der Verlust der PIP<sub>2</sub>-Bindung im Profilin-Molekül, wie in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, wirkt sich stark auf die Aktindynamik aus. Die angestiegene Verfügbarkeit sowohl von Profilin I als auch von PIP<sub>2</sub> durch die Expression von PFNI/LD führt zu einer anderen Verteilung der Aktinfilamenten. Die PIP<sub>2</sub>-Bindung erweist sich somit als wichtiger Faktor in der Regulation der Aktivität von Profilin auf das Aktin-Cytoskelett.

# **I      Einleitung**

## **1      Profilin**

Profilin ist ein 12-16 kDa großes, ubiquitär exprimiertes, G-Aktin-bindendes Protein (Carlsson et al., 1977), das in das Gleichgewicht von Aktin-Monomeren und Aktinfilamenten eingreift. Die Aktinmonomere (G-Aktin) polymerisieren reversibel in Abhängigkeit vom Nukleotid Adenosintriphosphat (ATP) und zweiwertigen Ionen, insbesondere Magnesium-Ionen (Kabsch et al., 1990), und Profilin kann diese Filamentbildung fördern (Goldschmidt-Clermont et al., 1992; Carlier, 1991). Im Komplex mit Profilin kann ATP-gebundenes G-Aktin (Profilaktin) mit erhöhter Affinität an das Plus-Ende von F-Aktin binden (Pring et al., 1992).

Profilin konnte in allen untersuchten eukaryotischen Organismen wie Protozoen, Echinodermata, Pflanzen, Insekten und Säugern nachgewiesen werden (Tilney et al., 1983; Valenta et al., 1991; Cooley et al., 1992; Machesky und Pollard, 1993; Haarer und Brown, 1990; Sohn und Goldschmidt-Clermont, 1994; Sun et al., 1995).

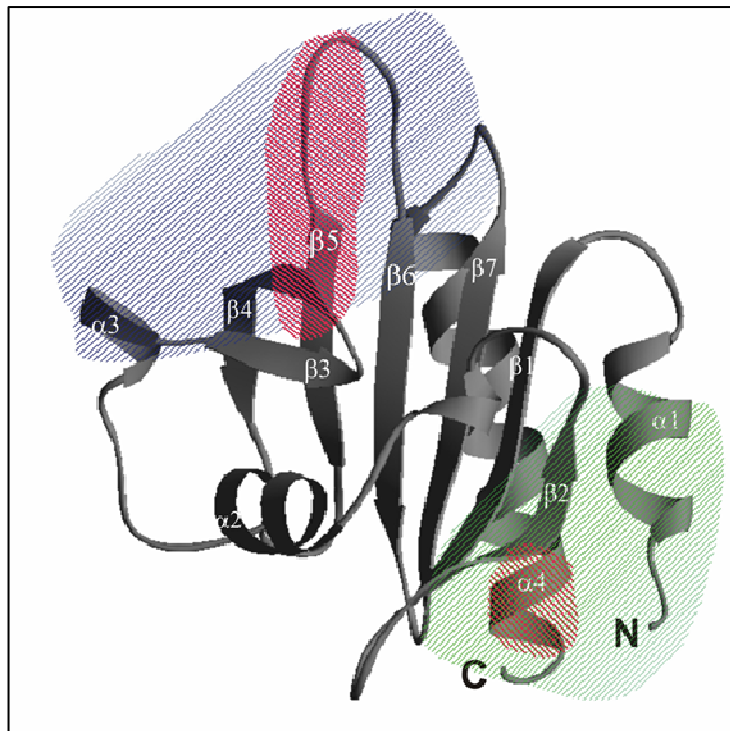
In verschiedenen Organismen wurden unterschiedliche Isoformen und Spleißvarianten identifiziert, die sich teilweise funktionell und biochemisch unterscheiden. In Säugern konnten fünf Isoformen nachgewiesen und charakterisiert werden, die von vier Genen codiert werden (Kwiatkowski et al., 1990; Di Nardo et al., 2000; Kwiatkowski und Bruns, 1988; Lambrechts et al., 2000; Lambrechts et al., 1995; Haugwitz et al., 1991; Binette et al., 1990; Hu et al., 2001; Obermann et al., 2005).

Die Profiline I und II der Säuger unterscheiden sich in ihrer gewebsspezifischen Expression. Profilin I, eine basische Isoform, wird in fast allen untersuchten Geweben exprimiert. Dagegen wird die saure Isoform Profilin IIa nur in Neuronen exprimiert, Profilin IIb unter anderem in Leber und Niere. Bei Profilin IIa und IIb handelt es sich um zwei Spleißvarianten eines Gens, die sich in den letzten 32 Aminosäureresten unterscheiden (Di Nardo et al., 2000; Honore et al., 1993; Hu et al., 2001; Lambrechts et al., 2000). Neue Studien zeigen, dass Profilin IIa durch die Interaktion mit Dynamin 1 auch eine Rolle im Endocytose-Prozess spielt (Gareus et al., 2006). Die Spleißvariante Profilin IIb stellt unter den verschiedenen Isoformen eine Ausnahme dar, da sie weder G-Aktin noch Poly-Prolin bindet (Di Nardo et al., 2000; Lambrechts et al., 2000). Die Expression von Profilin III ist auf Hoden und Nieren

beschränkt (Braun et al., 2002; Hu et al., 2001), und Profilin IV ist ausschließlich im Testis nachgewiesen worden (Obermann et al., 2005).

Trotz einer geringen Sequenzhomologie, die bei unterschiedlichen Spezies teilweise unter 25% liegt (Schlüter et al., 1997), ist die Tertiärstruktur der Profile hochkonserviert.

Die dreidimensionale Struktur von Rinder-Profilin, die von Schutt und Mitarbeitern (1993) durch Röntgenstrukturanalyse ermittelt wurde, ist in Abbildung 1 dargestellt.



**Abb. 1: Strukturmodell von Rinder-Profilin I.**

Profilin-Struktur nach Schutt et al., 1993, mit den Bindungsdomänen für Aktin (blau), Phosphoinositide (rot) und Poly-L-Prolin-Motive (grün) (übernommen aus Schlüter et al., 1997, modifiziert nach Lambrechts et al., 2002; Skare und Karlsson, 2002).

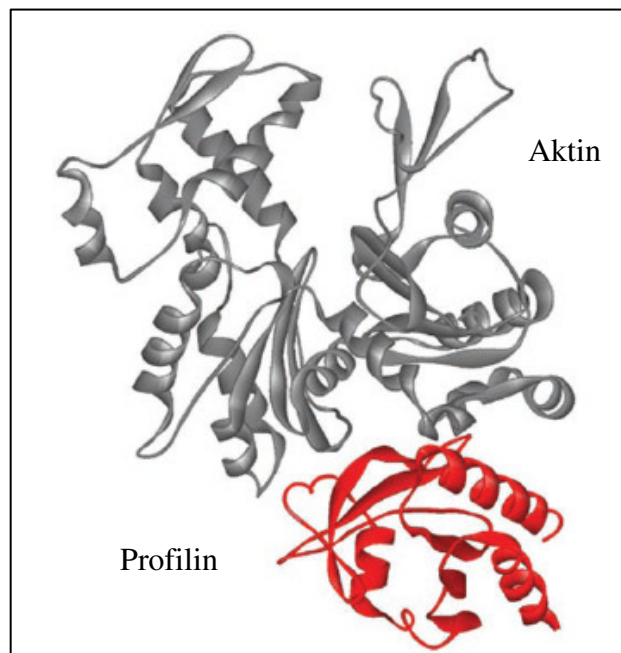
Typisch ist das zentrale  $\beta$ -Faltblatt mit sechs bis sieben antiparallelen Strängen; auf der einen Seite sind die zwei terminalen  $\alpha$ -Helices und auf der anderen Seite zwei weitere  $\alpha$ -Helices oder  $\beta$ -Faltblatt-Stränge lokalisiert (Schutt et al., 1993; Fedorov et al., 1994). In der Evolution scheint die Struktur von Profilin nicht einzigartig zu sein. Beispielweise zeigen einige Regionen von Gelsolin Analogie zur Struktur von Profilin (McLaughlin und Weeds., 1995). In den letzten Jahren sind weitere „profilin related“ Proteine entdeckt worden, die eine ähnliche Tertiärstruktur wie Profilin aufweisen, wie das Adaptor-Protein p14 (Qian et al., 2005). Allerdings besitzen diese Proteine nicht die typischen biochemischen Eigenschaften von Profilin.

Alle Profiline weisen in der Regel die gleichen Bindungsdomänen auf. So interagieren sie mit G-Aktin bzw. Aktin-ähnlichen Proteinen (Carlsson et al., 1977), sauren Phospholipiden wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Lassing und Lindberg, 1985) und Poly-L-Prolin-Liganden.

Neben ihrer unterschiedlichen Gewebsverteilung weisen die Profilin-Isoformen verschiedene Affinitäten für gleiche Liganden (Schlüter et al., 1997) und eine unterschiedliche Liganden-Spezifität (Witke et al., 1998) auf.

## 1.1 Liganden der Aktin-Bindungsdomäne von Profilin

Profilin bindet an G-Aktin stöchiometrisch in einem 1:1-Komplex. Die Kokristallisation durch Schutt et al. (1993) zeigte, dass die Interaktion von Profilin mit Aktin durch die Helix 3, die  $\beta$ -Faltblatt-Stränge 4, 5 und 6 sowie den N-terminalen Teil der Helix 4 an den Subdomänen 1 und 3 des Aktins vermittelt wird. Zusätzlich interagiert die N-terminale Helix mit der Subdomäne 4 von Aktin (Carlsson et al., 1977; Abb. 2).



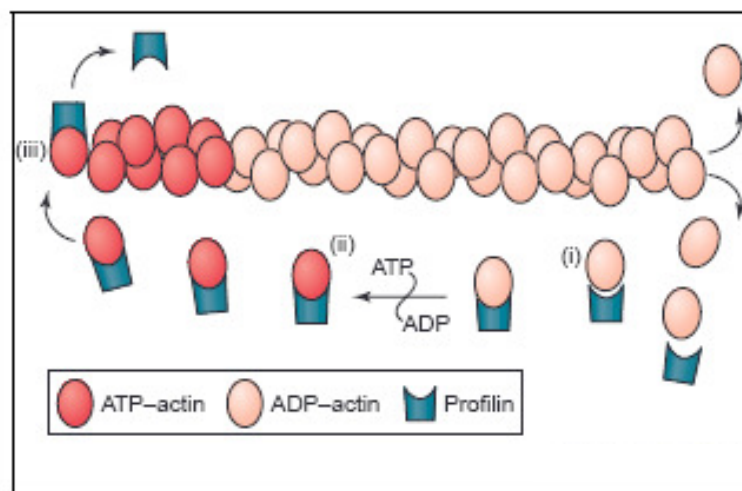
**Abb. 2: Struktur des Komplexes Aktin-Profilin.**

Struktur von Profilin (rot), kokristallisiert mit monomerem Aktin (grau) (Auflösung 2,55 Å; übernommen aus dos Remedios et al., 2003).

Durch die Bindung von Profilin an Aktin (Profilaktin-Komplex) wird die ATPase-Aktivität des Aktins inhibiert (Tobacman und Korn, 1982) und der Nukleotidaustausch am G-Aktin-

Molekül erhöht. Die Austauschrate von ATP zu ADP wird etwa um den Faktor 140 gesteigert (Selden et al., 1999) und Profilin kann mit 20-fach höherer Affinität ATP-Aktin anstelle von ADP-Aktin binden (Perelroizen et al., 1995). Zudem zeigen biophysikalische Simulationen, dass die offene Konformation von Aktin in Abwesenheit von Profilin nicht stabil ist. Die Ergebnisse dieser Studie unterstützen die Ansicht, dass Profilin den Nukleotid-Austausch im Aktin-Molekül fördert. Dies geschieht, in dem Profilin diese thermodynamisch nicht stabile Konformation des Aktins stabilisiert (Minehardt et al., 2006).

Bislang stellt Profilin den einzigen bekannten Nukleotid-Austausch-Faktor für G-Aktin dar. Im Komplex mit Profilin kann ATP-G-Aktin mit höherer Affinität an das Plus-Ende von filamentösem Aktin binden (Pring et al., 1992), was die Dissoziation von Profilin und die Addition des ATP-Aktins an das bestehende Filament zur Folge hat. Daher unterstützt Profilin die Aktinpolymerisation (Abb. 3).



**Abb. 3: Schematische Darstellung der Rolle von Profilin in der Aktinpolymerisation.**

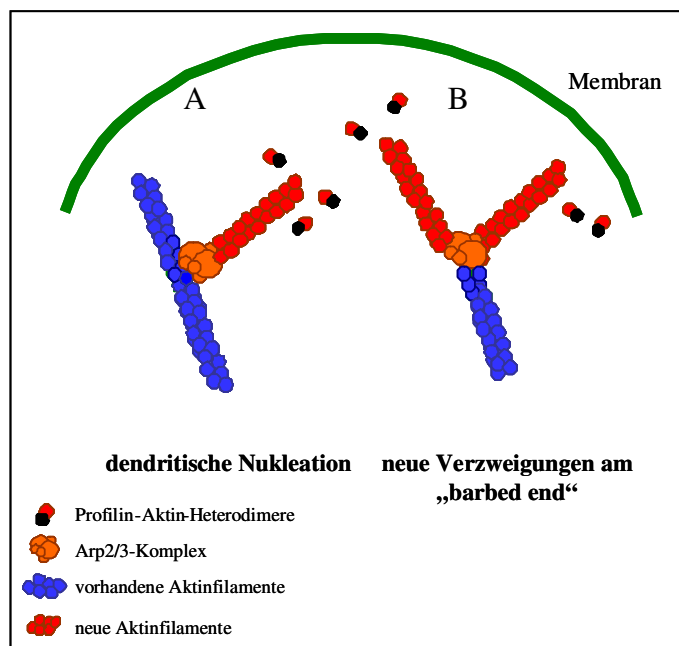
Profilin kann Aktin-Monomere binden und dabei die Konzentration an freiem Aktin reduzieren (i).

Profilin erhöht die Geschwindigkeit des Nukleotid-Austauschs und regeneriert somit den Pool von ATP-Aktin (ii). Der Komplex Profilin-ATP-Aktin interagiert mit dem Plus-Ende des Aktinfilaments und setzt dabei das ATP-Aktin-Monomer frei, das in das Filament eingebaut wird (iii). Die Verlängerung des Filaments findet durch ATP-Aktin statt.

Innerhalb des Filaments wird das ATP durch die ATPase-Aktivität von Aktin langsam hydrolysiert, so dass ADP-Aktin im ältesten Teil des Filaments generiert wird (übernommen aus Witke, 2004).

Neben G-Aktin bindet Profilin auch an Arp2 (actin related protein), eine Untereinheit des Arp2/3-Komplexes aus *Acanthamoeba* (Machesky et al., 1994; Mullins et al., 1998), welcher zur Familie der Aktin-verwandten Proteine gehört und zur Organisation des Cytoskeletts beiträgt. Der Arp 2/3-Komplex stellt einen Ansatzpunkt zur Generierung neuer

Aktinfilamente dar. Als „capping protein“ bindet Arp 2/3 das Minus-Ende von G-Aktin und bewirkt, an vorhandenen Aktinfilamenten gebunden, die Neubildung von F-Aktin, das zu bereits bestehenden Filamenten in einem Winkel von  $70^\circ$  steht (Abb. 4). In Bereichen hoher Aktindynamik werden durch den Arp 2/3-Komplex im corticalen Netz neue Verzweigungen von Aktinfilamenten angelegt (Pollard und Borisy, 2003).



**Abb. 4: Darstellung der Modelle zur Verzweigung von Aktinfilamenten durch den Arp2/3-Komplex.**

Modell 1: Der Arp2/3-Komplex bindet seitlich an ein existierendes Aktinfilament und nukleiert ein neues Aktinfilament (A). In (B) ist das zweite Modell dargestellt. Der Komplex bindet die Plus-Enden von Aktinfilamenten und erzeugt eine Verzweigung, aus der zwei neue Filamente entstehen. Die zwei Modelle könnten beide in der Zelle ablaufen (frei nach Condeelis, 2001).

Ein weiterer Interaktionspartner des Profilins I ist ein ubiquitär exprimiertes Protein, Gephyrin, das zunächst als Poly-Prolin-Ligand für Profilin I beschrieben wurde (Mammoto et al., 1998). Gephyrin nimmt eine essentielle Funktion in der inhibitorischen Reizleitung ein, da es sich um ein peripheres Membranprotein handelt, das auf der cytoplasmatischen Seite postsynaptischer Membranen für die Aggregation und Verankerung inhibitorischer Rezeptoren, wie Glycin- und  $\gamma$ -Aminobuttersäurerezeptoren, an das Cytoskelett verantwortlich ist (Essrich et al., 1998; Kirsch et al., 1993; Schmitt et al., 1987). Aufgrund von Homologien zu pflanzlichen und bakteriellen Proteinen wurde Gephyrin auch als Bestandteil der Molybdäncofaktor-Synthese identifiziert (Hille, 1996; Mendel, 1997; Rajagopalan and Johnson, 1992; Schwarz et al., 2000). Giesemann und Mitarbeiter konnten zeigen, dass Gephyrin, Aktin und Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) um die Bindung am Profilin I konkurrieren. Diese Ergebnisse weisen auf eine überlappende Bindungsregion im Profilin I-Molekül für Aktin, Gephyrin und  $\text{PIP}_2$  hin (Giesemann et al., 2003). Die biologische Relevanz der Interaktion des Profilins I mit Gephyrin ist jedoch noch nicht geklärt.

## 1.2 Interaktion von Profilin mit sauren Phospholipiden

Basierend auf der Röntgenstrukturanalyse von *Acanthamoeba*-Profilin wurde 1994 von Fedorov und Mitarbeitern eine potentielle Bindungsstelle für Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>) am Profilin-Molekül vorgeschlagen, die durch die Argininreste 55, 56 und 71 und die Lysinreste 80, 81 und 115 (in humanem Profilin I: 74, 88, 90, 125) gebildet wird. Dieser Bereich überlappt mit der Aktin-Bindungsstelle, was die Konkurrenz zwischen Aktin und PIP<sub>2</sub> für die Bindung an Profilin erklären kann (Lassing und Lindenberg, 1985). Durch Mutationsanalysen wurde die Bindungsregion im Bereich des Argininrestes 88 eingegrenzt (Sohn et al., 1995).

Die Affinität des Profilins für saure Phospholipide ist höher als die für G-Aktin. Die Bindung von PIP<sub>2</sub> führt *in vitro* aufgrund einer Konformationsänderung des Profilins zur Dissoziation des Profilin-Aktin-Komplexes (Lassing und Lindberg, 1985, 1988; Machesky et al., 1990), so dass Aktin aus diesem Komplex entlassen wird (Raghunathan et al., 1992). Daher ist eine gleichzeitige Bindung von G-Aktin und Phosphoinositiden an Profilin nicht möglich (Lassing und Lindberg, 1985; Machesky et al. 1990). Weitere Studien zeigten, dass Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat und Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat mit einer höheren Affinität an Profilin binden als Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (Lu et al., 1996).

Am C-Terminus von Profilin I liegt eine zweite Bindungsstelle für saure Phospholipide (Lambrechts et al., 2002; Skare und Karlsson, 2002). Diese C-terminale Region, welche den Lysinrest 125 sowie die Argininreste 135 und 136 umfasst, liegt in unmittelbarer Nähe zur Poly-L-Prolin-Bindungsregion (Lambrechts et al., 2002; Skare und Karlsson, 2002). Durch die Substitution des Argininrests 136 mit einem Asparaginsäurerest wird die Interaktion zwischen Profilin und PIP<sub>2</sub> stark reduziert, aber auch die Interaktion mit Poly-L-Prolin-Liganden wird vermindert (Lambrechts et al., 2002).

Profilin bindet somit an PIP<sub>2</sub> in zwei Regionen, die jeweils mit den Bindungsstellen für Aktin und Poly-L-Prolin-Liganden überlappen. Dies führt zur Konkurrenz für die Bindung an Profilin I. Aus diesem Grund kann PIP<sub>2</sub> als Hauptregulator der Funktion von Profilin betrachtet werden (Lambrechts et al., 2006).

### 1.3 Wechselwirkung von Profilin mit Poly-L-Prolin-Liganden

Die Wechselwirkung von Profilin mit Poly-L-Prolin konnte bereits 1985 von Tanaka und Shibata gezeigt werden. Zunächst wurde diese Eigenschaft ausschließlich zur Isolierung des Proteins mittels Affinitätschromatographie genutzt (Lindberg et al., 1988; Kaiser et al., 1986). Da über diese Methode auch G-Aktin-Profilin-Komplexe isoliert werden konnten, zeigte sich schon zu diesem Zeitpunkt, dass keine Kompetition zwischen der Bindung von G-Aktin und Poly-L-Prolin besteht.

Als erster natürlicher Ligand des Poly-L-Prolin-Bindungsmotivs wurde das „vasodilator-stimulated phosphoprotein“ (VASP) beschrieben (Reinhard et al., 1995; Haffner et al., 1995). In der Zwischenzeit konnten zahlreiche Proteine identifiziert werden, die über prolinreiche Sequenzen an Profilin binden, wie Enabled/Mena (Gertler et al., 1996), Proteine der WASP-Familie (Suetsugu et al., 1998; Miki et al., 1998), Formine (Krebs et al., 2001, Watanabe et al., 1997), Cappuccino (Manseau et al., 1996), Bn1p (Evangelista et al., 1997), Bnr1p (Imamura et al., 1997), Cdc12p (Balasubramanian et al., 1994) und Palladin (Boukhelifa et al., 2006).

Durch den Nachweis der Interaktion von Profilin mit dem „survial of motor neuron“-Protein (SMN), dessen Ausfall zur spinalen Muskelatrophie führt (Lefebvre et al., 1995), wurde ein Ligand entdeckt, der mit Profilin im Zellkern kolokalisiert (Giesemann et al., 1999).

Zudem scheint Profilin durch die Bindung des Myb-Transkriptionsfaktors p42POP mit an der Regulation der Transkription beteiligt zu sein (Lederer et al., 2005).

Viele dieser Proteine sind in Signaltransduktionskaskaden involviert, die zelluläre Signale in gerichtete Aktinpolymerisation umsetzen.

Durch Mutationsanalysen in der Spaltheife *Schizosaccharomyces pombe* konnte die essentielle Funktion der Wechselwirkung zwischen Profilin und prolinreichen Liganden gezeigt werden (Lu und Pollard, 2001). Eine Reduzierung der Affinität für Polyprolin-Motive führt zu einem letalen Phänotyp.

Die Profilin-Isoformen unterscheiden sich nicht nur in ihren Affinitäten zu Poly-L-Prolin, es wurde zudem eine unterschiedliche Ligandenspezifität nachgewiesen (Suetsugu et al., 1998; Witke et al., 1998). Nodelman und Mitarbeiter (1999) führen diese Spezifität auf verschiedene isoelektrische Punkte der beiden Isoformen (humanes Profilin I: pI 8,4; Profilin IIa: pI 5,9) und Differenzen in den geladenen und hydrophoben Aminosäuren, sowohl innerhalb als auch in unmittelbarer Umgebung der Poly-L-Prolin-Bindungsdomäne, zurück.



## 2 Die zelluläre Funktion von Profilin I

Die zelluläre Funktion von Profilin konnte bislang nicht vollständig aufgeklärt werden. Studien mit verschiedenen Organismen ergaben jedoch, dass Profilin I eine essentielle Komponente des Mikrofilamentsystems ist. Profilin I-„knock-out“-Mäuse sterben in einem frühen Stadium während der Embryonalentwicklung (Witke et al., 2001). Die Deletion von Profilin I in Mutanten von *Schizosaccharomyces pombe* (Balasubramanian et al., 1994) und der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* (Verheyen und Cooley, 1994) führt zu einem letalen Phänotyp.

Anfangs wurde vermutet, dass Profilin als Puffer für den G-Aktin-Pool agieren könnte. Diese Rolle wird aber heute dem Protein Thymosin  $\beta$ 4 zugeschrieben, welches sowohl eine höhere Affinität für G-Aktin hat als auch in der notwendigen Konzentration in der Zelle vorliegt (Carlier et al., 1993; Pantaloni und Carlier, 1993; Safer et al., 1991). Thymosin  $\beta$ 4 bildet mit ATP-gebundenem Aktin einen 1:1-Komplex und verhindert dessen Polymerisation (Nachmias, 1993; Safer et al., 1991). Die Konzentration von Profilin in der Zelle reicht nicht aus, um den Aktin-Pool zu stabilisieren (Southwick und Young, 1990).

Die Interaktion zwischen Aktin und Profilin ist entscheidend für die normale Entwicklung vieler Organismen.

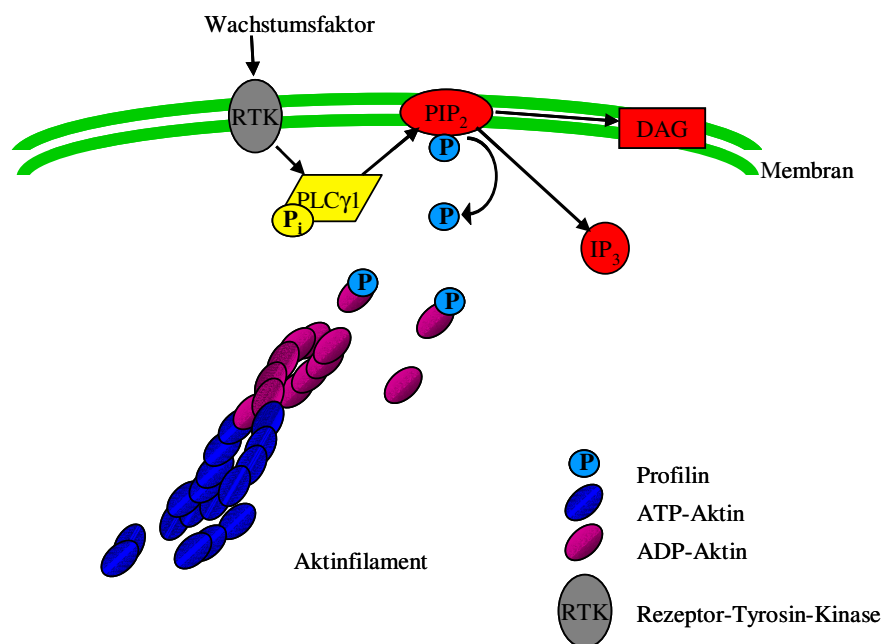
Die Expression von Profilin-Mutanten, die eine gestörte Bindung zu Aktin besitzen, kann beispielsweise die Länge von Neuriten in PC12-Zellen reduzieren und inhibiert dazu stark die Bildung von Filopodien (Lambrechts et al., 2006).

Mutagenese-Studien in *Saccharomyces cerevisiae* zeigen, dass die Aktin-bindenden Regionen im Profilin-Molekül *in vivo* eine sehr wichtige Funktion übernehmen, da Profilin eine schnelle Aktindynamik fördert (Wolven et al., 2000).

In der Spaltheefe *Saccharomyces pombe* wurden ebenfalls Mutationsanalysen durchgeführt. Aus diesen Studien geht hervor, dass die Bindung von Profilin an Aktin für ein normales Wachstum der Hefe notwendig ist. Die Aktin- und die Poly-L-Prolin-Bindungsstellen werden, unabhängig voneinander, benötigt, damit Profilin seine biologische Funktion ausführen kann (Lu und Pollard, 2001).

Die Mikroinjektion permanent quervernetzter Profilin-G-Aktin-Komplexe sowie die Expression von mutiertem Profilin, das kaum mehr mit G-Aktin interagieren kann, hat in der Zelle eine Reduzierung des F-Aktin-Gehalts zur Folge (Nyman et al., 2002).

Die Bindung von Profilin an sauren Phospholipiden und die damit verbundene Lokalisation an der Membran ist abhängig vom Phospholipid-Signalweg.  $\text{PIP}_2$  ist ein membranständiges Phospholipid mit einem cytosolischen Inositolrest, der an verschiedenen Positionen phosphoryliert werden kann und durch die Phospholipase  $\text{C}\gamma 1$  in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) gespalten wird. Im Fall einer Bindung von Profilin an  $\text{PIP}_2$  kann das Phospholipid nicht mehr durch das Enzym hydrolysiert werden (Goldschmidt-Clermont et al., 1990). Erst nachdem die Phospholipase  $\text{C}\gamma 1$  durch G-Protein-gekoppelte Rezeptoren oder Rezeptor-Tyrosin-Kinasen phosphoryliert und somit aktiviert wird, kommt es zur Spaltung zwischen Profilin und dem gebundenen  $\text{PIP}_2$  (Goldschmidt-Clermont et al., 1991). Profilin wird aus dem Komplex mit  $\text{PIP}_2$  freigesetzt, wodurch es wieder für die Aktindynamik zur Verfügung steht (Abb. 4). Durch DAG und  $\text{IP}_3$ , die als *second messenger* fungieren, wird  $\text{Ca}^{2+}$  ins Cytoplasma freigesetzt, was zur Aktivierung von Calcium-abhängigen Proteinen führt, die ihrerseits die Aktindynamik beeinflussen können, wie z.B. Gelsolin.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der  $\text{PIP}_2$ -abhängigen Regulation von Profilin.**

Wachstumsfaktoren können die Rezeptor-Tyrosin-Kinasen aktivieren, die wiederum die Phospholipase  $\text{C}\gamma 1$  phosphorylieren. Das aktivierte Enzym spaltet  $\text{PIP}_2$  in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-1,4,5-Triphosphat ( $\text{IP}_3$ ). Profilin wird dadurch freigesetzt und kann lokal die Polymerisation von Aktin fördern (frei nach Schlüter et al., 1997).

Neue Studien zeigen, dass die Wechselwirkung von Profilin I und  $\text{PIP}_2$  ein dynamischer Prozess ist. Diese Interaktion könnte der regulatorische Schlüssel sein, um das Gleichgewicht

zwischen der Integrität des Cytoskeletts und der Verfügbarkeit von PIP<sub>2</sub> für den Calcium/PKC-Signalweg in Herzmuskelzellen zu erhalten (Evans und Walker, 2006).

Die PIP<sub>2</sub>-vermittelte Reorganisation des Aktin-Cytoskeletts ist daher bei membranassoziierten Prozessen wie der Zellmotilität von Bedeutung. Über die Interaktion mit PIP<sub>2</sub> wird Profilin in kortikalen Bereichen mit höherer Aktindynamik rekrutiert, wie beispielsweise Filopodien und Lamellipodien (Buss et al., 1992; Mayboroda et al., 1997). Profilin ist in Zellen vor allem in Regionen mit einer hohen Aktindynamik, wie z.B. der Führungslamelle, lokalisiert (Buss et al., 1992). Eine Koloalisation mit dynamischen Aktinfilamenten ist auch für die durch Serumentzug induzierbaren Aktinfilamente in BHK-21-Zellen beschrieben worden (Rothkegel et al., 1996). Die Bindung von Profilin an PIP<sub>2</sub> ist ebenfalls entscheidend für die Entwicklung von Neuriten in PC12-Zellen (Lambrechts et al., 2006).

Mayboroda und Mitarbeiter (1997) konnten eine Kernlokalisation von Profilin zeigen. Im Cytoplasma ist das Protein mit dem Mikrofilamentsystem, im Zellkern mit dem „survival of motor neuron“ (SMN) assoziiert (Giesemann et al., 1999). Daher wird Profilin auch als „dual compartment“-Protein bezeichnet. 2003 wurde für den Profilin-Aktin-Komplex ein neuer Rezeptor, Exportin 6, beschrieben, der in Säugertierzellen den Komplex erkennt und ihn aus dem Zellkern transportieren kann (Stuven et al., 2003).

Die Geschwindigkeit der Fortbewegung von humanpathogenen Bakterien wie *Listeria monocytogenes* und *Shigella flexneri* korreliert mit dem Profilingehalt der von diesen Bakterien gebildeten Kometenschwänze. Die Depletion von Profilin oder VASP führt bei diesen Organismen zur Reduzierung der Aktin-vermittelten Motilität (Laurent et al., 1999, Theriot et al., 1994).

Die Herunterregulierung von Profilin I mittels RNA-Interferenz (RNAi) in Zellen, die dann mit dem „respiratory syncytial virus“ (RSV) infiziert wurden, zeigt, dass Profilin für die Zellfusion benötigt wird und für die virale Reifung und die Bildung von Stressfasern essentiell ist (Bitko et al., 2003).

In allen untersuchten Organismen spielt Profilin somit eine kritische Rolle in der Organisation des Aktin-Cytoskeletts (Ayscough, 1998).

Untersuchungen an Neuronen haben gezeigt, dass Profilin nach synaptischer Stimulierung die Aktindynamik in „dendritic spines“ stabilisieren kann (Ackermann und Matus, 2003). Die subzelluläre Verteilung von Profilin I ist in den verschiedenen Regionen des Gehirns sehr heterogen, wie immunhistologische Untersuchungen zeigen. Profilin I kann sowohl in prä- als

auch in postsynaptischen Strukturen lokalisiert sein und übernimmt eine wichtige Rolle bei deren Gestaltung (Neuhoff et al., 2005; Lamprecht et al., 2006).

Profilin ergibt in seiner zellulären Funktion ein sehr komplexes Bild. Es ist sowohl für Organismen als auch für einzelne Zellen essentiell. Die Interaktion von Profilin mit Aktin und somit seine Verbindung mit dem Aktin-Cytoskelett spielt eine große Rolle. Aber auch die Wechselwirkung mit PIP<sub>2</sub> und Poly-L-Prolin-Liganden impliziert regulierende Einflüsse von Profilin auf das Mikrofilamentsystem.

### **3 Die Rolle von Profilin I als Tumorsuppressor-Protein**

Die Überexpression von Onkogenen und die eingeschränkte oder komplett unterbundene Funktion von Tumorsuppressorgen führen in ihrer Summe zumeist zu einer unkontrollierten Zellproliferation, der Suppression apoptotischer Signale in der Zelle und schließlich zu einer Expansion der transformierten Zellpopulation (Hunter, 1991; Yokota, 2000)

Ein kritischer Schritt der Tumorprogression ist das Erlangen von metastatischem Potential. Das geschieht, wenn in Zellen des Primärtumors die Fähigkeit entsteht, sich aus dem Tumor zu lösen und in das umliegende Gewebe einzuwandern. Nachfolgend können diese Zellen Kapillaren und Lymphbahnen penetrieren, um dann in andere, entfernte Gewebe transportiert zu werden, wo die metastasierenden Zellen extravasieren müssen, um an der neuen Stelle proliferieren zu können (Fidler et al., 1978; Nicolson, 1982).

Für diese Prozesse müssen die Tumorzellen neue Proteine exprimieren und die Expression anderer Proteine einstellen.

Veränderungen in der Morphologie, in der Organisation des Aktin-Cytoskeletts, im adhäsionsabhängigen Zellwachstum und in der Motilität, sowie der Verlust von Kontaktinhibitionen sind in vielen Fällen auf die Transformation von Zellen in Gewebekulturen zurückzuführen.

Der geringere Organisationsgrad des Mikrofilamentsystems, der häufig mit einem tumorigenen Phänotyp korreliert, hängt mit der veränderten Expression von Cytoskelett-Proteinen zusammen (Button et al., 1995; Pawlak and Helfman, 2001).

In zahlreichen Studien ist belegt worden, dass Cytoskelett-Proteine wie Tropomyosin (Matsumura et al., 1983), Transgelin (Shapland et al., 1988),  $\alpha$ -Aktinin (Gluck et al., 1993), Gelsolin (Vandekerckhove et al., 1990) und Vinculin (Rodriguez Fernandez et al., 1992) in Tumorgewebe oder transformierten Zellen reduziert exprimiert werden.

In allen Fällen war es möglich, eine Suppression des tumorigenen Phänotyps durch Anhebung des Proteinsspiegels mittels Transfektion zu erreichen.

Janke und Mitarbeiter (2000) konnten zeigen, dass auch das humane Profilin I eine Tumorsuppressor-Aktivität in den Brustkrebszellen CAL51 besitzt.

Die CAL51-Zelllinie wurde 1985 am „Cancer Center Antoine-Lacassagne“ (Frankreich) von einem invasiven Brust-Adenokarzinom isoliert und in Kultur genommen. Entgegen vielen anderen etablierten Brustkrebs-Zelllinien besitzen die CAL51-Zellen einen normalen Karyotyp und die Wildtypform des Tumorsuppressorgens p53 (Gioanni et al., 1990).

Das mRNA-Profil von CAL51-Zellen zeigt, dass die Transkription von Profilin I stark reduziert ist. Weitere Analysen belegen, dass, im Vergleich zu normalen Brustepithelzellen, auch mehrere andere Brustkrebszelllinien eine niedrigere Expression von Profilin I besitzen (Janke et al., 2000).

Die Ursachen für die Reduzierung des Profilinspiegels in Brustkrebszellen wurden untersucht. Deletionen oder Mutationen im codierenden Bereich eines Genes oder die Hypermethylierung des Promotors sind oft für die reduzierte Proteinexpression von Tumorsuppressorproteinen verantwortlich. Janke et al. (2000) fanden aber keine Mutation oder Deletion im codierenden Bereich. Eine starke Methylierung von Promoterregionen bestimmter Gene resultiert in einer Bindungshemmung von RNA-Polymerasen oder Transkriptionsfaktoren, so dass es zur reduzierten Transkription des Gens kommt (Leung et al., 2003). Dies ist häufig bei Tumorsuppressorproteinen, wie z.B. E-Cadherin, der Fall (Chen et al., 2003). Eine Hypermethylierung des Promotors wurde aber als Ursache für die reduzierte Profilinexpression ausgeschlossen (Jandrig, persönliche Mitteilung).

Die Anhebung des Profilinspiegels in CAL51-Zellen durch Transfektion von Profilin I-cDNA führte ebenfalls zur Supprimierung der Tumor-Eigenschaften. Die Klone zeigten kürzere Generationszeiten, eine höhere Organisation des Aktin-Cytoskeletts, eine deutliche Reduzierung des verankerungsabhängigen Wachstums in Weichagar und ein besseres Absetzverhalten. Außerdem konnte die Suppression der Tumorbildung in Nacktmäusen gezeigt werden (Janke et al., 2000).

Weitere Untersuchungen wurden mit Zellklonen, die stabil rekombinantes und mutiertes Profilin exprimierten, durchgeführt. Aus diesen Analysen ging hervor, dass eine intakte Aktin-Bindungsstelle für die Tumorsuppressor-Aktivität von Profilin in humanen Epithelzellen essentiell ist. Die Mutation R88L, die zu einer schwächeren Interaktion zwischen PIP<sub>2</sub> und Profilin führt, kann noch die Tumorbildung supprimieren (Wittenmayer et al., 2004).

## **4 Ziel der Arbeit**

Der Verlust von Profilin oder eine reduzierte Expression des Proteins ist für Organismen letal oder führt zur Entartung von Zellen. Die Ursache für eine reduzierte Expression von Profilin in Brustkrebszellen ist noch nicht geklärt, aber die Restauration des Proteinspiegels in CAL51-Zellen führt zur vollständigen Suppression des tumorigenen Phänotyps (Janke et al., 2000). Damit Profilin seine Aktivität als Tumorsuppressorprotein ausüben kann, ist eine intakte Aktinbindungsstelle notwendig (Wittenmayer et al., 2004).

In dieser Arbeit sollte zunächst die Expression von Profilin I in CAL51-Zellen mittels RNAi-Technologie reduziert werden, um die Effekte einer weiteren Senkung des Profilingehaltes zu untersuchen. Ferner sollten Analysen unternommen werden, um die Rolle von Profilin in Bezug auf die Interaktion mit verschiedenen Liganden aufzuklären. Dafür sollten Klone generiert werden, die Wildtyp-Profilin I, eine PIP<sub>2</sub>-Bindungsmutante und eine Aktin-Bindungsmutante des Proteins exprimieren und deren mRNAs jeweils resistent gegenüber einer Profilin I-spezifischen siRNA sind. Die generierten Zellklone sollten bezüglich der Expression der mutierten Profile vor und nach der RNAi-Behandlung analysiert werden. Die Analyse der Organisation des Mikrofilamentsystems, des verankerungsunabhängigen Wachstums, des Absetz- und Ausbreitungsverhaltens, der Zellmigration und des Differenzierungsgrades auf Matrigel™ sollten weitere Erkenntnisse über den Einfluss von Profilin-Liganden auf die Aktindynamik ergeben.

## II Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Geräte

Blotter	Semi-Dry-Blot, Biometra
DNA-Sequenziergerät	ABI PRISM™ 310 Genetic Analyzer, PE Applied Biosystems GmbH, Weiterstedt
Eppendorf Thermomixer	Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg
Fluoreszenzmikroskop	Axiophot, Zeiss Germany
Geldokumentationsanlage	Software Easywin, Herolab GmbH, Wiesloch
Gelelektrophoreseapparatur	Nautiko 810, Labortechnik Fröbel, Lindau
Heizblock	DRI-Block DB-2A, Techne
Heizrührer	RCTbasic, IKA Labortechnik, Staufen
Inkubator	Steri-Cult 200, Forma Scientific, Ohio, USA
Kühlzentrifuge	J2-MC, Beckmann, München
Lichtmikroskop	Telaval 31, Zeiss Germany
Power Supply	Consort E455 und E734, Labortechnik Fröbel, Lindau
Real Time PCR Gerät	DNA Engine Opticon®2 RT-PCR Detection System (MJ Research)
Real Time PCR Software	Opticon Monitor™-Software
Rundschüttel-Inkubator	Certomat, Braun, Biotech International, Melsungen
Thermocycler	PTC 200, MJ Research, Watertown, Massachusetts, USA
Tischzentrifuge	Biofuge 13, Heraeus, Hanau 113, Sigma, Osterode am Harz 3K15, Sigma, Osterode am Harz
Transilluminator	Biometra, Göttingen
Ultraschallgerät	Cell Disruptor B-12, Branson Sonic Power Co., Danbury, USA
UV-Leuchttisch	E.A.S.Y. RG, Herolab GmbH, Wiesloch
UV-VIS Spektrophotometer	UV 1202, Shimadzu, Duisburg
Vortex	Genie 2™, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz

## 1.2 Chemikalien und Enzyme

Die eingesetzten Chemikalien wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Applichem (Darmstadt), Difco (Hamburg), Qiagen (Hilden), Serva (Heidelberg), Sigma-Aldrich (Deisenhofen), ICN (Eschwege) und Invitrogen (Karlsruhe) bezogen.

Bezugsquelle für Enzyme waren, sofern nicht anders vermerkt, die Firmen New England Biolabs (Frankfurt am Main), Stratagene (Heidelberg), Boehringer (Mannheim), Promega (Mannheim).

Medien und Reagenzien für die Kultivierung tierischer Zellen lieferten die Firmen PAA Laboratories (Cölbe) und Biochrom AG (Berlin).

## 1.3 Medien

Die Anzucht von *Escherichia coli* (*E. coli*) erfolgte in autoklaviertem LB- oder 2x YT-Vollmedium.

### LB-Medium:

10 g/l NaCl  
10 g/l Trypton  
5 g/l Hefeextrakt  
mit NaOH pH 7,5 einstellen

### 2x YT-Vollmedium:

10 g/l NaCl  
16 g/l Trypton  
10 g/l Hefeextrakt  
mit NaOH pH 7,5 einstellen

Für Agar-Platten wurde den Medien 1,5% (w/v) Agar zugesetzt.

Die Selektion der rekombinanten Klone erfolgte entsprechend den verwendeten Vektoren durch die Zugabe von 150 µg/ml Ampicillin oder 30 µg/ml Kanamycin in das Medium.

## 1.4 Bakterienstämme

Für die Klonierung von DNA-Konstrukten und zur Expression von rekombinanten Proteinen wurden die *E. coli* Stämme *XL1-blue* und *BL21 (DE3)* eingesetzt.

Die Stämme weisen folgende relevante genotypische Merkmale auf:



**XL1-blue:** supE44 hsdR17 recA1 endA1 gyrA46thi relA1 lac<sup>-</sup> F'[proAB<sup>+</sup> lacI<sup>q</sup> lacZΔM15 tn10(tet<sup>r</sup>)] (Bullock et al., 1987)

**BL21 (DE3):** F<sup>-</sup>, *ompT*, *r<sub>B</sub><sup>-</sup>m<sub>B</sub><sup>-</sup>hsdS gal* (*λcIts857*, *ind1*, *Sam7*, *nin5*, *lac* UV5-T7 gene 1) (Studier und Moffatt, 1986)

## 1.5 Zelllinien

Folgende Zelllinien, freundlicherweise von Prof. Dr. S. Scherneck (Max-Delbrück-Centrum für Molekulare Medizin, Berlin) zur Verfügung gestellt, wurden in dieser Arbeit verwendet:

**CAL51:** Humane epitheliale Brustkrebszelllinie (Gioanni et al., 1990)

**CAL17-5:** Generiert durch Transfer von einem Teil des humanen Chromosoms 17 in CAL51-Zellen (Theile et al., 1995)

**MCF-10A:** Humane nicht transformierte Epithelzelllinie (Soule et al., 1990)

## 1.6 Vektoren

Die Konstrukte, die für die Transfektion in Zellen verwendet wurden, waren in einen modifizierten pcDNA3-Vektor kloniert (pcDNA-BiPro). Dieser Vektor trägt in seiner „multiple cloning site“ vor der *EcoRI*-Schnittstelle eine DNA-Sequenz, die das Epitop des anti-Birkenprofilin Antikörpers 4A6 (BiPro-Epitop: SFPQFKPQEI) codiert (Rüdiger et al., 1997).

Die Profilin-cDNAs wurden synthetisch hergestellt (GeneArt, Regensburg) und in den Vektor durch die Schnittstellen *EcoRI*/*XhoI* inseriert.

Für die Expression in Bakterien wurde die entsprechende DNA-Sequenz des rekombinanten BiPro-markierten Profilin I in den pET21c+-Vektor (Novagen, Madison) inseriert.

Alle Konstrukte wurden sequenziert, amplifiziert und dann für die Expression in CAL51-Zellen bzw. *E. coli*-Zellen verwendet.

## 1.7 Oligodesoxynukleotide

Im Rahmen dieser Arbeit wurden für DNA-Sequenzierungen die folgenden Oligodesoxynukleotide eingesetzt:

**Tab. 1:** Sequenzierungs-Oligodesoxynukleotide (MWG Biotech AG)

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
T7Promfor	ATTAATACGACTCACTAT
WZ126rev	TCTAGCATTTAGGTGACA

Für die transiente Transformation von Zellen wurden die folgenden siRNA-Duplices verwendet:

**Tab. 2:** Sequenzen der siRNA-Duplices

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
Kontrolle (nicht-silencing)	sense: UUCUUCGAACGUGUCACGUdTdT
pfn1-si-1	sense: AGAAGGUGUCCACGGUGGUdTdT
pfn1-si-2	geschützte Sequenz: Hs_PFN1_7_HP Validated siRNA (Qiagen)

Der pfn1-si-2 siRNA-Duplices wurde von der Firma Qiagen bezogen. Die Sequenz ist unbekannt, aber er erkennt einen Bereich der mRNA, der in der 5' codierenden Region lokalisiert ist, während pfn1-si-1 eine Sequenz erkennt, die in der 3' codierenden Region lokalisiert ist.

Die für die „Real Time“-PCR verwendeten Oligodesoxynukleotide sind in Tabelle 3 aufgelistet.

**Tab. 3:** Primer für die „Real Time“-PCR (MWG Biotech AG)

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
RT-hPFN1-sense	GGGAAAACGTTTCGTCAACAT
RT-hPFN1-antisense	ACACCTTCTTTGCCCATCAG
RT-modhPFN1-sense	CGGCAAGACGTTTGTCAATA
RT-modhPFN1-antisense	GGACCAGCGTTTGTGTCAGTT
RT-GAPDH-sense	GAGTCAACGGATTTGGTCGT
RT-GAPDH-antisense	GACAAGCTTCCCGTTCTCAG
RT-Aktin-sense	GGCATCCTGACCCTGAAGTA
RT-Aktin-antisense	CTTCTCTCTGTTGGCCTTGG

## 1.8 Antikörper

Für den Nachweis von Proteinen im Immunblot und in der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper sowie die eingesetzten Verdünnungen sind in den Tabellen 4 und 5 aufgeführt.

**Tab. 4:** Verwendete Primärantikörper

Spezifität	Name	Spezies	Quelle	Fixierung	Verdünnung	
					IF	IB
Anti-G-actin	2G2	Maus	EH	-	-	1:1000
Anti-BiPro-tag	4A6	Maus	EH	PFA	1:10	1:10
Anti-profilin	2H11	Maus	EH	PFA	1:2	1:10
Anti-profilin	PFN1-Antiserum	Kaninchen	EH	PFA	1:100	-
Anti-tubulin	DM1A	Maus	Sigma	MeOH	1:500	1:5000
Anti-VASP	M4	Kaninchen	Alexis	PFA	1:500	1:1000
Anti-vinculin	hvin1	Maus	Sigma	PFA	1:1000	1:1000

IF = Immunfluoreszenz; IB = Immunblot; EH = Eigene Herstellung (Sabine Buchmeier, AG Jockusch)

**Tab. 5:** Verwendete Sekundärantikörper

Spezifität	Name	Quelle	Spezies	Verdünnung	
				IF	IB
anti-Immunglobulin aus Maus, Peroxydase gekoppelt	a-Maus IgG HRP	Sigma	Kaninchen	-	1:10000
anti-Immunglobulin aus Kaninchen, Peroxydase gekoppelt	a-Kaninchen HRP	Sigma	Ziege	-	1:10000
anti-Immunglobulin aus Maus, TRITC gekoppelt	a-Maus IgG TRITC	Sigma	Ziege	1:400	-
anti-Immunglobulin aus Maus, FITC gekoppelt	a-Maus IgG FITC	Sigma	Ziege	1:200	-
anti-Immunglobulin aus Kaninchen, TRITC gekoppelt	a-Kaninchen IgG TRITC	Sigma	Ziege	1:100	-
anti-Immunglobulin aus Kaninchen, FITC gekoppelt	a-Kaninchen IgG FITC	Sigma	Ziege	1:50	-
anti-Immunglobulin aus Maus, Alexa-Fluor 488	a-Maus IgG Alexa 488	Molecular Probes	Ziege	1:250	-

HRP = Horse Radish Peroxidase; TRITC = Tetramethyl-Rhodium-Isothiocyanat; FITC = Fluorescein-Isothiocyanat

Spezifische Agenzien für fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen:

- Phalloidin-FITC (Sigma): 1:200
- Phalloidin-TRITC (Sigma) 1:400
- DAPI (Appllichem) 1:1000

## **2 Methoden**

### **2.1 Mikrobiologische Methoden**

#### **2.1.1 Anzucht von Bakterien (*E. coli*)**

Zur Anzucht von *E. coli* wurden Einzelkolonien in 2,5 ml LB-Medium über Nacht bei 37°C und im Rundschüttler bei 220 rpm inkubiert. Größere Schüttelkulturen wurden im Verhältnis 1:5 oder 1:10 in LB-Medium angeimpft und ebenfalls über Nacht bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Zur Selektion rekombinanter Klone wurde dem Medium in Abhängigkeit vom Vektor Kanamycin (30 µg/ml) bzw. Ampicillin (150 µg/ml) zugesetzt.

#### **2.1.2 Lagerung von Bakterien**

Für die kurzfristige Lagerung wurden Stammkulturen auf Agarplatten mit entsprechenden Antibiotikazusätzen ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C.

Die langfristige Lagerung erfolgte in Glycerinkulturen bei -70°C. Dazu wurde das Pellet einer 2 ml Übernachtskultur in 0,5 ml Medium aufgenommen und mit 0,5 ml sterilem Glycerin (87%) vermischt.

### **2.2 Molekularbiologische Methoden**

#### **2.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien für die Transformation**

Um bei einer Transformation Fremd-DNA in Bakterien einzuschleusen, mussten die Bakterienzellen zuvor für die DNA-Aufnahme „kompetent“ gemacht werden. Das geschieht durch eine Veränderung ihrer Zellwand. Durch folgende Methode konnten kompetente Bakterien hergestellt werden:

100 ml einer Bakterien-Kultur wurden in LB-Medium bei 37°C bis zu einer optischen Dichte ( $OD_{600\text{ nm}}$ ) von 0,5 angezogen und anschließend 5 min auf Eis gekühlt. Nach Zentrifugation der Bakteriensuspension für 10 min bei 5000 rpm, 4°C wurde das Bakteriensediment in

100 ml TFB I resuspendiert und anschließend für 10 min auf Eis gestellt. Nach weiterer Zentrifugation für 10 min bei 5000 rpm, 4°C wurde das Pellet in 5 ml TFB II aufgenommen. Die Suspension wurde sofort in 200 µl-Portionen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei –80°C gelagert.

**TFB I:**

300 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 5,8  
10 mM CaCl<sub>2</sub>  
100 mM NaCl  
50 mM MnCl<sub>2</sub>  
15% (v/v) Glycerin

**TFB II:**

10 mM MOPS, pH 7,0  
75 mM CaCl<sub>2</sub>  
10 mM NaCl  
15% (v/v) Glycerin

### **2.2.2 Transformation kompetenter Bakterien**

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und 50 µl der Bakterien mit 5 µl Ligationsansatz oder 0,1 bis 0,5 µg Plasmid-DNA versetzt. Dieser Ansatz inkubierte 30 min auf Eis. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock bei 42°C für 30 s, um die Effizienz der DNA-Aufnahme zu erhöhen. Nach Abkühlung auf Eis (5 min) wurde der Ansatz mit 200 µl LB-Medium versetzt und unter leichtem Schütteln bei 37°C inkubiert. Die Inkubation erfolgte ohne Antibiotika, da die für die Resistenz erforderlichen Proteine erst exprimiert werden mussten. Zur Selektion der transformierten Bakterien-Klone wurde der Transformationsansatz auf antibiotikahaltige LB-Agar-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

### **2.2.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien**

1,5 ml einer *E. coli* Übernachtskultur wurden 5 min bei 6000 rpm zentrifugiert und das Bakteriensediment in 300 µl P1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Bakterien erfolgte durch Zugabe von 300 µl P2-Puffer, die Neutralisation durch Zugabe von 300 µl P3-Puffer. Um die ausgefällten Proteine und Zelltrümmer abzutrennen, wurde zweimal 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Durch die Zugabe von 620 µl Isopropanol zum Überstand wurde die DNA ausgefällt und für 30 min bei 13000 rpm präzipitiert. Das DNA-Pellet wurde mit 400 µl 70%igem Ethanol gewaschen, bei 37°C getrocknet und anschließend in 50 µl Milli-Q (MQ) Wasser aufgenommen.

P1-Puffer:

50 mM Tris-HCl, pH 8,0

10 mM EDTA

100 µg/ml RNase A

P2-Puffer:

200 mM NaOH

1% SDS

P3-Puffer:

3 M Kaliumacetat, pH 5,5

## 2.2.4 Plasmid-Midi-Präparation

Um Plasmid-DNA mit einem hohen Reinheitsgrad für die Transfektion eukaryotischer Zellen zu erhalten, wurde für die Plasmidpräparation der *Qiagen Plasmid Purification Kit* (Qiagen), der nach dem Prinzip der Anionenaustausch-Chromatographie funktioniert, verwendet.

Die Durchführung dieser Plasmidpräparation erfolgte nach den Angaben des „Qiagen Plasmid Handbook“.

Die isolierte Plasmid-DNA wurde in 200 µl steriles Wasser aufgenommen.

## 2.2.5 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren erfolgte über die Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (Absorption der Purin- und Pyrimidinbasen). Eine Absorption von 1,0 entspricht für doppelsträngige DNA einer Konzentration von 50 µg/ml, für einzelsträngige DNA und RNA von 40 µg/ml. Der Verunreinigungsgrad der DNA-Lösung durch Proteine oder Phenole wird über das Verhältnis der Absorption bei 260 nm und 280 nm (Absorption der aromatischen Aminosäurereste und Phenole) ermittelt. Der Quotient  $OD_{260}/OD_{280}$  sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Durch Proteinverunreinigungen wird der Quotient zu kleineren Werten verschoben.

## 2.2.6 DNA-Hydrolyse mit Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonucleasen des Typs II erkennen spezifisch 4 bis 8 Nukleotide lange palindromische DNA-Sequenzen und spalten doppelsträngige DNA durch Hydrolyse der Phosphodiester-Brücken der Nukleinsäuren. In Abhängigkeit der verwendeten Restriktionsendonuclease entstehen dabei einzelsträngige 5'- oder 3'- überhängende Enden („sticky ends“) oder doppelsträngige glatte Enden („blunt ends“). Für eine analytische

Untersuchung wurden 0,5-1 µg DNA, für eine präparative Restriktionsspaltung 3-5 µg DNA eingesetzt. Das Reaktionsvolumen betrug stets 10-50 µl und es wurden 1-2 Enzymeinheiten pro 1 µg DNA eingesetzt. Die Reaktionsbedingungen wie Inkubationszeit und Reaktionspuffer wurden entsprechend den Herstellerangaben gewählt. Enzyme mit unterschiedlichem Reaktionspuffer wurden nacheinander eingesetzt und die jeweiligen Pufferbedingungen gesondert eingestellt.

### 2.2.7 Ligation

Mit Hilfe von DNA-Ligasen können DNA-Fragmente neu kombiniert werden, da sie die Bildung von Phosphodiesterbrücken zwischen freien 5'-Phosphat- und 3'-Hydroxyl-Gruppen katalysieren. Diese Reaktion wird für die Insertion von Fremd-DNA in Vektoren genutzt. Für die in dieser Arbeit durchgeführten Ligationen wurde die ATP-abhängige T4-DNA-Ligase benutzt. Vor der Ligation wurden sowohl das Insert als auch der Vektor mit Restriktionsenzymen geschnitten, die kompatible Enden erzeugen. Das Gesamtvolumen der Ligationsansätze betrug 15 µl (0,2-1 µg Insert und 0,1-0,5 µg Vektor in einem Verhältnis von etwa 3:1, 1,5 µl 10x Ligase-Puffer, 5 U T4-DNA-Ligase). Der Ligationsansatz wurde entweder 1 h bei RT oder über Nacht bei 16°C inkubiert.

Für eine Transformation in Bakterien wurde dieser Ansatz ohne weitere Behandlung eingesetzt.

### 2.2.8 Agarose-Gelelektrophorese

Aufgrund ihres unterschiedlichen Molekulargewichtes können DNA-Fragmente in einer Agarosematrix im elektrischen Feld voneinander getrennt und identifiziert werden. Dabei bewegt sich die DNA wegen der negativ geladenen Phosphatgruppen in Richtung der Anode. Je nach Größe der zu trennenden Fragmente wurden 0,6-1,2%ige Agarose-Gele in 0,5x TBE-Puffer verwendet. Durch Zugabe von Ethidiumbromid (0,5 µg/ml), welches in die doppelsträngige DNA interkaliert, wurden die DNA-Fragmente unter UV-Licht sichtbar gemacht. Vor dem Auftragen wurde die DNA in 5x Probenpuffer aufgenommen. Als Längenstandard wurde *EcoRI/HindIII* verdaute DNA des Phagen λ aufgetragen.

0,5x TBE-Puffer:

27 g/l Tris/HCl, pH 8,0  
13,75 g/l Borsäure  
10 ml 0,5 M EDTA, pH 8,0

5x Probenpuffer:

0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylecyanol  
30% Glycerin in 5x TBE

## 2.2.9 DNA-Fragmentisolierung

Für die Isolierung spezifischer DNA-Fragmente aus Agarosegelen wurde der „QIA<sup>®</sup>EXII Gel Extraction Kit“ (Qiagen) benutzt. Das zu isolierende DNA-Fragment wurde unter UV-Licht aus dem Gel ausgeschnitten, die negativ geladene DNA an Glasmilch gebunden und anschließend gemäß den Angaben des Herstellers eluiert.

## 2.2.10 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Diese Methode wurde zur exponentiellen Amplifikation definierter DNA-Fragmente angewandt. Das Prinzip beruht darauf, dass man die Nukleinsäuren, die die gewünschte Sequenz enthalten, mit einem Überschuß von zwei Primern hybridisiert, die aus den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz stammen und strangspezifisch sind. Dadurch entstehen kurze Doppelstrangbereiche, die für die Taq-DNA-Polymerase als Startpunkte dienen. Diese besonders hitzestabile DNA-Polymerase hat ein Temperaturoptimum von über 70°C und ist auch für kurze Zeit bei 95°C stabil.

## 2.2.11 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung erfolgte über den *AmpliTa<sup>®</sup> FS BigDye Terminator Kit* der Firma PE Applied Biosystems. Die Sequenzierungsreaktion beruht auf dem Kettenabbruchverfahren von Sanger (Sanger et al., 1977) und ähnelt einer PCR. Hier wird allerdings nur ein Primer eingesetzt und zusätzlich zu den Desoxynukleotiden (dNTPs) werden dem Reaktionsansatz auch Didesoxynukleotide (ddNTPs) zugegeben.

Durch Verwendung fluorchrommarkierter ddNTPs können die DNA-Moleküle im ABI Prism<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) mit Hilfe eines Lasers detektiert werden. Die Auswertung der Sequenzreaktion erfolgt automatisch über die zugehörige Software.



In einem Sequenzierungsansatz wurden 5 pmol Sequenzierungsprimer, 0,3 µg DNA und 2 µl Premix, in dem AmpliTaq<sup>®</sup>-Polymerase FS, dNTPs und fluorchrommarkierte ddNTPs enthalten waren, in einem Gesamtvolumen von 10 µl eingesetzt. Die Sequenzier-PCR fand in einem Thermocycler statt (10 s 96°C; 5 s 50°C; 4 s 60°C; 25x). Da nicht eingebaute markierte Nukleotide bzw. Primer zu einem starken Hintergrund führen können, wurden die Ansätze durch eine Ethanol-fällung gereinigt. Anschließend wurde die DNA in 12,5 µl TSR (Template Supression Reagent, PE AppliedBiosystems) aufgenommen und für 2 min bei 90°C denaturiert.

Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte durch Kapillarelektrophorese mit dem ABI Prism<sup>™</sup> 310 Genetic Analyzer nach Herstellerangaben.

### **3 Biochemische Methoden**

#### **3.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem Profilin I**

pET-Vektoren (Novagen), die als Insert cDNA-Fragmente des Profilin I (PFNI) beinhalten, wurden zur Expression in den *E. coli*-Stamm BL21(DE3) hereingebracht. Die Kulturen wurden in 1,5 l 2xYT-Medium, mit den jeweiligen Antibiotika als Selektionsmarker, bis zu einer OD von 0,5 bei 600 nm im Schüttelinkubator bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Durch Zugabe von 1 mM Isopropylthiogalaktosid (IPTG) (Endkonzentration) wurde die Expression induziert und für 4 h fortgeführt. Anschließend wurde die Bakteriensuspension bei 6000 rpm für 15 min und 4°C zentrifugiert, das Sediment in 100 ml kaltem Lysispuffer aufgenommen und für 20 min auf Eis mit 1 mg/ml Lysozym inkubiert. Durch Ultraschall-Behandlung (10 x 30 s, 80 W mit je 30 s Pause im Eiswasserbad) wurden die Bakterien aufgeschlossen. Größere Zellbestandteile wurden durch Zentrifugation für 50 min bei 14000 rpm und 4°C entfernt.

Für die Aufreinigung von Profilin nutzt man dessen Interaktion mit Poly-L-Prolin (Tanaka und Shibata, 1985).

Das klare bakterielle Lysat wurde auf eine Poly-L-Prolin-Sepharose-Säule (30 ml Säulenvolumen) aufgetragen. Die Säule wurde mit Waschpuffer bei einer Fließgeschwindigkeit von 50 ml/h gewaschen, bis die Messung der OD bei 280 nm 0,01 zeigte, dass kein Protein mehr herunter gewaschen wurde. Unspezifisch gebundene Proteine wurden mit 2 M Harnstoff in Waschpuffer von der Säule entfernt. Die Elution des gebundenen Profilins erfolgte durch Zugabe von 6 M Harnstoff in Waschpuffer, was zur Denaturierung des Proteins führt, bei einer Fließgeschwindigkeit von 40 ml/h. Das Eluat

wurde fraktioniert, mittels einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) analysiert und die Profilin I-haltigen Fraktionen vereinigt. Um die Renaturierung des Profilins nach der Elution zu ermöglichen, wurde die Profilin-haltige Lösung anschließend über 40 h in fünf Schritten mit abnehmender Harnstoff- und Dithioerythritol (DTE)-Konzentration dialysiert. Nach Ankonzentrierung und Konzentrationsbestimmung wurden die Profile 1:2 mit Glycerin versetzt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Die gereinigten rekombinanten Profile dienten als Standard für quantitative Immunblots.

**Lysispuffer:**

50 mM Tris-HCl, pH 7,5  
10 mM EDTA  
10 mM NaCl  
1,5% Triton X-100  
50  $\mu\text{M}$  Pefabloc SC  
1  $\mu\text{M}$  Pepstatin A  
20 U/ml Aprotinin (Trasylol)

**10x Waschpuffer:**

200 mM Tris-HCl, pH 7,6  
1,5 M NaCl

**10x Dialysepuffer:**

100 mM Tris-HCl  
2 mM  $\text{CaCl}_2$

### **3.2 Bestimmung der Protein-Konzentration nach Bradford (1976)**

Um die Konzentration der Proteine zu ermitteln, wurde der Bradford-Test verwendet. Diese Methode eignet sich am besten für Protein-Konzentrationen im Bereich von 10 bis 100  $\mu\text{g/ml}$ . Bei der Bindung von Coomassie Brilliantblau G250 an Proteine im sauren Milieu verschiebt sich das Absorptionsmaximum der Lösung. Während der ungebundene Farbstoff ein Absorptionsmaximum bei  $\lambda = 465\text{ nm}$  zeigt, liegt das Absorptionsmaximum in Gegenwart von Proteinen bei  $\lambda = 595\text{ nm}$ .

Der Absorptionsanstieg bei  $\lambda = 595\text{ nm}$  wurde photometrisch ermittelt. Zur Herstellung einer Eichgerade wurden je 20  $\mu\text{l}$  einer Standard-Lösung (1 mg/ml Rinderserumalbumin) in einer Verdünnungsreihe (Doppelbestimmung) von 25-200  $\mu\text{g/ml}$  pipettiert. Die zu messenden Proben wurden 1:2 bis 1:10 verdünnt und ebenfalls zu je 20  $\mu\text{l}$  in Mikrotiterplatte vorgelegt. Standard-Lösungen und Proben wurden mit 100  $\mu\text{l}$  des Bradford-Reagenz vermischt. Nach 15 min wurde photometrisch die Absorption bei einer Wellenlänge von 595 nm bestimmt. Anhand der erstellten Eichgerade wurde der Proteingehalt der Proben ermittelt.

### 3.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese können Proteine gemäß ihrer Größe in einem Polyacrylamid-Gel (PAA-Gel) aufgetrennt und analysiert werden. Natriumdodecylsulfat (SDS) ist ein stark negativ geladenes Detergens, das an hydrophobe Bereiche von Proteinen bindet und sie denaturiert. Seine stark negative Ladung bewirkt, dass alle Proteine negativ geladen vorliegen und ihre Eigenladung zu vernachlässigen ist. Die Proteine wandern so im elektrischen Feld entsprechend ihrem Molekulargewicht.

Die Proteinproben wurden mit 5x Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95°C erhitzt. Entsprechend der Molekulargewichte der zu analysierenden Proteine wurden Gele mit unterschiedlicher Polyacrylamid-Konzentration verwendet (s. Tabelle 6).

**Tab. 6:** Rezeptur für 6 SDS-Glycin-Minigele im Format 5 x 8 x 0,1 cm (Höhe x Breite x Tiefe)

	<b>10%</b>	<b>12,5%</b>	<b>13,75%</b>	<b><i>Sammelgel</i></b>
<b>dH<sub>2</sub>O</b>	12,4 ml	9,9 ml	8,65 ml	<i>6,2 ml</i>
<b>Trenngellösung*</b>	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml	-
<b>Sammelgellösung*</b>	-	-	-	<i>2,5 ml</i>
<b>Acrylamidlösung (30%)</b>	10 ml	12,5 ml	13,75 ml	<i>1,3 ml</i>
<b>10% APS</b>	200 µl	200 µl	200 µl	<i>200 µl</i>
<b>TEMED</b>	10 µl	10 µl	10 µl	<i>10 µl</i>
<b><i>Trennbereich kDa</i></b>	<i>30-130</i>	<i>20-100</i>	<i>16-60</i>	

\*Trenngellösung: 1,5 M Tris/HCl, pH 8,8; 0,4% SDS; Sammelgellösung: 0,5 M Tris/HCl, pH 6,8; 0,4% SDS

Die Gelelektrophorese erfolgte bei konstanten Spannungen von 80 V (Sammelgel) und 120 V (Trenngel). Im Anschluss wurden die Gele entweder mit Coomassie Brilliantblau G250 gefärbt und zur Verdeutlichung der Proteinbanden wieder entfärbt oder für einen Immunblot weiter verwendet. Als Größenstandard diente „prestained protein weight marker“ (New England Biolabs, s. Tabelle 7)

5x SDS-Page Probenpuffer:

0,38 M Tris/HCl, pH 6,8

2% SDS (w/v)

12% Glycerin (w/v)

0,05% Bromphenolblau

SDS-Elektrophoresepuffer:

50 mM Tris/HCl, pH 8,7

0,1% SDS (w/v)

400 mM Glycin

Färbelösung:

200 ml Essigsäure

250 ml Isopropanol

0,5 g Coomassie Brilliantblau G250

auf 2 l mit dH<sub>2</sub>O auffüllenEntfärbelösung:

200 ml Essigsäure

250 ml Isopropanol

auf 2 l mit dH<sub>2</sub>O auffüllen**Tab. 7:** Prestained protein marker (Sigma)

Protein	Quelle	Molekulargewicht (kDa)
MBP- $\beta$ -Galactosidase	<i>E.coli</i>	175
MBP-Paramyosin	<i>E.coli</i>	83
Glutamat-Dehydrogenase	Rinderleber	62
Aldolase	Kaninchenmuskel	47,5
Triosephosphat Isomerase	Kaninchenmuskel	32,5
$\beta$ -Lactoglobulin A	Rindermilch	25
Lysozym	Hühnereiweiss	16,5
Aprotinin	Rinderlunge	6,5

**3.4 Nachweis von Proteinen im Immunblot**

Mit der Methode des Immunblots (Westernblots) können Proteine durch spezifische Antikörper nachgewiesen werden. Die Proteine wurden mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurden das Gel, eine Nitrocellulose-Membran und sechs Whatman-Papiere in Blotpuffer äquilibriert. Drei Lagen Whatman-Papier wurden auf die Anodenplatte der Semi-dry-Blotkammer gelegt, darauf eine Nitrocellulose-Membran und das Gel, das mit weiteren drei Lagen Whatman-Papier überschichtet wurde.

Anschließend wurde die Kathodenplatte auf- und die Spannung angelegt. Geblottet wurde für 60 min bei einer Stromstärke von 2-3 mA/cm<sup>2</sup> Gel (ca. 100 mA/Minigel).

Mittels reversibler Ponceau-Färbung wurde der Transfer überprüft. Die Entfärbung der Membran erfolgte mit dH<sub>2</sub>O. Anschließend wurde die Membran zur Absättigung unspezifischer Bindungen für 1 h in 5% Milchpulver in 1x TBS-T inkubiert. Dann folgte für 2 h bei RT auf dem Schüttler die Inkubation mit dem ersten Antikörper, welcher mit 1x TBS-T verdünnt wurde. Nach dreimaligem, zehnminütigem Waschen mit TBS-T, um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurde ein gegen den ersten Antikörper gerichteter Sekundärantikörper für 45-60 min bei RT zugegeben. Nach anschließendem Waschen mit 1x TBS-X und 1x TBS-T erfolgte die Entwicklung des Blots.

Der Nachweis von HRP-konjugierten Sekundärantikörpern (horse radish peroxidase) fand nach dem „enhanced chemoluminescence“- (ECL) -System der Firma GE Healthcare statt. Dieses System beruht auf einer Chemolumineszenzreaktion, bei der mit Hilfe der Peroxidase, die an den Sekundärantikörper gekoppelt ist, unter Lichtemission Luminol oxidiert wird. Das Licht wurde mittels Röntgenfilm nachgewiesen. Die Durchführung erfolgte nach Herstellerangaben.

Blotpuffer:

25 mM Tris/HCl, pH 8,5  
150 mM Glycin  
10% (v/v) Methanol

1x TBS-T:

0,02 M Tris/HCl, pH 8,8  
0,14 M NaCl  
0,1% Tween 20

1x TBS-X:

0,02 M Tris/HCl, pH 8,8  
0,14 M NaCl  
0,1% Triton X-100

## **4 Zellbiologische Methoden**

### **4.1 Kultivierung von Zellen**

Die Zelllinie CAL51 wurde in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) mit 10% hitzeinaktiviertem (45 min und 56°C zur Inaktivierung der Komplementfaktoren) fötalem Kälberserum (FCS) supplementiert und ohne Zusatz von Antibiotika kultiviert. Die Derivate aus CAL51 wurden in dem gleichen Medium mit Zusatz von 800 µg/ml G418 kultiviert. Die Zelllinie MCF-10A wurde in DMEM + HAM'S F-12 Medium mit folgenden Zusätzen kultiviert: 5% Pferde Serum, 20 ng/ml Epidermal Growth Factor, 10 µg/ml Insulin, 500 ng/ml Hydrocortison. Die Kultivierung der Zelllinie erfolgte unter Standard-Bedingungen in Zellkulturplatten mit 24 oder 6 Vertiefungen oder in 10 cm-, 6 cm- und 3,5 cm-Zellkulturschalen (Nunc, Wiesbaden).

Die Zellen wurden im Inkubator bei 37°C, 10% CO<sub>2</sub>-Konzentration und 90% Luftfeuchtigkeit gehalten.

### **4.2 Passagieren von Zellen**

Adhärente Zellen können durch schonende Behandlung mit Proteasen von ihrem Substrat abgelöst werden. Je nach Zelldichte mussten die Zellen nach ca. 2-3 Tagen neu ausgesät werden. Nach einmaligem Waschen der Zellen mit 1x PBS wurden diese mit einer Trypsin/EDTA-Lösung (TE-Lösung) in PBS bei 37°C inkubiert, bis sich die Zellen abgelöst hatten. Das Ablösen der Zellen wurde unter dem Mikroskop verfolgt. Durch Zugabe des doppelten Volumens Medium wurde die proteolytische Wirkung des Trypsins abgestoppt, die Zellzahl mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und die Zellen in der entsprechenden Zellkonzentration neu ausgesät.

#### 1x PBS:

137 mM NaCl

3mM KCl

8mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4

### **4.3 Kryokonservierung von Zellen**

Die Kryokonservierung dient dazu, Zellen über einen längeren Zeitraum hinweg zu lagern. Als Gefrierschutzmittel wurde Dimethylsulfoxid (DMSO) verwendet, welches die Bildung von Eiskristallen innerhalb und außerhalb der Zellen sowie die partielle Dehydratation des Cytoplasmas verhindert. Zum Einfrieren wurden Zellen einer semi-konfluenten 10 cm-Kulturschale abtrypsinisiert, bei 4000 rpm sedimentiert und in 5 ml DMEM, an dem 20% FCS und 10% DMSO addiert wurden, aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wurde in 1 ml Kryoröhrchen (National Lab, Mölln) überführt und bei -80°C für mindestens 24 h eingefroren. Arbeitskulturen wurden weiter bei -80°C aufbewahrt, während Zellen für die langfristige Konservierung in flüssigen Stickstoff bei -196°C gelagert wurden.

### **4.4 Auftauen von kryokonservierten Zellen**

Die Kryoröhrchen wurden im Wasserbad bei 37°C aufgetaut, die Zellsuspension mit 9 ml frischem Medium verdünnt und in einer 10 cm-Kulturschale ausgesät. Nach 24 h wurde dann das Medium gewechselt, um das DMSO zu entfernen.

### **4.5 Stabile Transformation von Zellen**

Bei der stabilen Transformation sollen spezifisch transfizierte Zellen selektioniert werden. Hier wurde ein positives Selektionsverfahren mit Geneticin (G418) benutzt. Durch Zugabe von G418 überleben nur Zellen, denen durch Aufnahme eines Plasmids eine entsprechende Resistenz vermittelt wurde. Dabei kann eine zufällige Integration der Plasmid-DNA in das Genom der Zellen erfolgen.

In einer 10 cm-Zellkulturschale wurden  $5 \times 10^5$  Zellen ausgesät und nach 24 h transfiziert. Als Transfektionsreagenz wurde FuGene<sup>TM</sup> (Roche) verwendet. Dabei handelt es sich um einen nicht liposomalen Lipidmix, der eine hohe Transfektionseffizienz ermöglicht. 3 µg Plasmid-DNA wurde mit DMEM auf ein Volumen von 100 µl aufgefüllt, 6 µl FuGene<sup>TM</sup> zugegeben und gut vermischt. Während einer 20minütigen Inkubation bei RT wurde den Zellen 6 ml frisches Medium zugegeben und anschließend der Transfektionsansatz zugetropft.

Spätestens 48 h nach der Transfektion erfolgte zur Selektion stabil transformierter Klone die Zugabe von 800 µg/ml G418. Die für die Selektion einzusetzende G418-Konzentration

variiert zwischen den unterschiedlichen Zelllinien und muss deshalb für jede Zelllinie ausgetestet werden. In einem Vorversuch wurde die Geneticin-Konzentration ermittelt, bei der die Zellen nach 6 Tagen abgestorben waren. Eine Woche nach Beginn der Selektion mit 800 µg/ml G418 war ein massives Absterben der Zellen zu beobachten. Die lebenden Zellen wurden abtrypsinisiert, für die Isolierung von Zellklonen ausgesät und weiterkultiviert.

#### **4.6 Klonierung eukaryotischer Zellen**

Zur Isolierung adhärenter Zellklone wurden Klonierungszyylinder verwendet. Es wurden 200 Zellen in einer 10 cm-Kulturschale (Nunc, Wiesbaden) in geneticinhaltigem Kulturmedium ausgesät und die Einzelzellen nach dem Absetzen mit einem Stift auf der Unterseite der Platte markiert. Nach 10-14 Tagen wurde die Platte mit PBS gewaschen und anschließend sterile, in Silikon (Basilone-Paste Bayer, Roth, Karlsruhe) gelagerte Klonierungszyylinder um die einzelnen Zellklone platziert. Durch Zugabe von je 50 µl TE-Lösung in die Klonierungszyylinder und Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gelöst. Das Abstoppen der Proteasereaktion erfolgte durch die Zugabe von 100 µl DMEM. Die Zellsuspension wurde in die Vertiefung einer 24-Loch-Platte überführt und auf ein Gesamtvolumen von 500 µl mit Medium aufgefüllt.

#### **4.7 Protein „knock down“ mittels RNA-Interferenz**

Bei der RNA-Interferenz handelt es sich um einen sehr spezifischen Mechanismus, der das selektive Ausschalten der Expression eines Proteins ermöglicht.

24 Stunden vor der transienten Transfektion der Zellen mit siRNA (short interfering RNA)-Duplices wurden  $2,5-5 \times 10^4$  Zellen in einer 24-Loch Platte ausgesät. 2 µl einer 40 mM siRNA-Lösung wurden mit 98 µl ECR-Puffer (Qiagen) versetzt und gut gemischt. Anschließend wurden 6 µl einer kationischen Lipid-Mischung, RNAiFect (Qiagen), hinzugegeben und 15 min bei RT inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurde den Zellen 300 µl frisches Medium zugegeben. Die Mischung wurde langsam auf die Zellen getropft. Anschließend wurden diese weiter bei 37°C inkubiert und in bestimmten Zeiträumen abtrypsinisiert, um Zellextrakte oder Immunfluoreszenz-Präparate herzustellen.



## 4.8 Herstellung von Zellextrakten

Zur Herstellung von Gesamtproteinextrakten wurden die Zellen abtrypsinisiert, die Reaktion durch Zugabe von Medium abgestoppt, die Zellsuspension 5 min bei 4000 rpm zentrifugiert, das Medium abgenommen und das Zellpellet anschließend bei -80°C eingefroren und gelagert.

Zum Gebrauch wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut und in Lysispuffer (20 µl pro  $1 \times 10^5$  Zellen) resuspendiert. Nach einer Inkubation von 15 bis 30 min auf Eis wurde die Suspension mehrmals in einer 1 ml Spritze mit einer feinen Kanüle (26G) geschert. Die Zelllysate wurden bei 13000 rpm (Biofuge) für 5 min zentrifugiert, der Überstand in ein neues Gefäß überführt und der Proteingehalt der Lösung mittels Bradford-Test bestimmt. Das übrige Zelllysate wurde bei -80°C eingefroren.

### Lysispuffer:

- 50 mM Tris-HCl, pH 7,4
- 10 mM NaCl
- 5 mM EDTA
- 0,3% (v/v) Triton X -100
- 100 µM Pefabloc SC
- 1 µM Pepstatin A
- 10 µM Leupeptin
- 20 U/ml Aprotinin (Trasylol)

## 4.9 Fluoreszenzmikroskopie

Die indirekte Immunfluoreszenz ermöglicht die fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Lokalisation von Proteinen in fixierten und permeabilisierten Zellen. Der Antikörper dringt dabei durch die permeabilisierte Zellmembran in die Zelle ein, bindet dort an das Zielprotein und wird durch die Bindung eines Fluorochrom-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

Beim direkten Nachweis können Proteine oder Strukturen über Fluorochrom-konjugierte Agenzien angefärbt werden. So erfolgte die Darstellung des Aktin-Cytoskeletts mittels Fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin.

Für fluoreszenzmikroskopische Studien wurden die Zellen auf runden Deckgläschen (12 mm Durchmesser) in 24-Loch-Platten ausgesät und kultiviert. Um zelluläre Strukturen darstellen zu können, mussten die Zellen fixiert werden. Je nach benutztem Primärantikörper wurden die Zellen unterschiedlich fixiert.

#### **Formaldehyd-Fixierung:**

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und für 20 min mit einer Formaldehyd-Lösung (PFA: 4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS, pH 7,3) bei Raumtemperatur inkubiert. Die Fixierlösung wurde entfernt und das Präparat noch dreimal mit PBS gewaschen. Vor der Antikörper-Inkubation wurden die Zellen mit einer Triton X-100-Lösung (0,2% (v/v) Triton X-100 in PBS) für 2 min inkubiert und anschließend erneut mit PBS dreimal gewaschen.

#### **Methanol-Fixierung:**

Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, dann wurde 1 ml Methanol (-20°C) zugegeben und 4 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Methanol durch Waschen mit PBS entfernt.

Um die Glasfläche benetzbar zu machen, wurden die Deckgläschen 2-3 min mit 1% BSA in PBS bedeckt. Nach Absaugen der Lösung wurden 30 µl des entsprechenden Primärantikörpers aufgetropft und in einer feuchten Kammer für 60 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, erneut mit 1% BSA in PBS benetzt, 30 min mit dem Zweitantikörper wie oben inkubiert und wieder dreimal mit PBS gewaschen. Die Färbung mit Fluorochrom-gekoppeltem Phalloidin erfolgte zeitgleich mit der Zweitantikörper-Inkubation.

Vor der Einbettung der Fluoreszenzpräparate wurden diese kurz in dH<sub>2</sub>O getaucht und damit gespült. Mowiol mit Bleichschutz wurde auf einen Objektträger getropft und die Präparate eingebettet. Die Präparate wurden 24 h bei 37°C getrocknet und unter Verwendung geeigneter Filter für Rhodamin- und Fluorescein-Färbungen am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Zur Dokumentation wurden mit der Kamera (Micro Max, Princeton Instruments, Inc.) Bilder aufgenommen. Die Bildverarbeitung erfolgte mit der Software MetaMorph®.

Mowiol:

20 g Mowiol 4-88 (Hoechst)  
80 ml PBS  
ü.N. bei RT rühren lassen  
40 ml Glycerin zugeben und ü.N.  
rühren lassen  
1 h bei 30.000 rpm zentrifugieren  
Überstand abnehmen und im Dunkeln  
bei 4°C lagern.

Bleichschutz:

2,5 g n-Propylgallat  
50 ml PBS  
50 ml Glycerin zugeben und ü.N.  
rühren lassen  
bei 4°C im Dunkeln lagern.

Vor der Verwendung wurden Mowiol und Bleichschutz im Verhältnis 3:1 gemischt.

#### 4.10 „TUNEL apoptosis assay“

Mit dem „TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) assay“ können apoptotische Zellen anhand ihrer fragmentierten DNA nachgewiesen werden. Caspase-aktivierte DNasen (CAD) bauen während der Apoptose die DNA ab. An die 3'-OH-Fragmentenden der DNA hängt die Terminale-Deoxynukleotidyl-Transferase (TdT) fluoreszenzmarkierte Nukleotide (dUTP-FITC) an. Für die TUNEL-Färbung wurde der *In-Situ Cell Death Detection Kit* (Roche) verwendet.

$2,5 \times 10^4$  Zellen wurden auf Deckgläschen in 24-Loch-Platten ausgesät. Nach 24 Stunden wurden die Zellen mit siRNA-Duplices transfiziert und anschließend, nach weiteren 24 Stunden, mit einer 4%igen Formaldehyd-Lösung bei RT 30 min fixiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen mit Triton (0,1% Triton X-100 in 0,1% Natrium Citrat) permeabilisiert und für 2 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen noch dreimal mit PBS gewaschen und den Angaben des Herstellers entsprechend gefärbt.

Die Auswertung der markierten apoptotischen Zellen fand am Fluoreszenzmikroskop statt.

#### 4.11 Adhäsion und „spreading“ von Zellen

Um das Absetz- und Ausbreitungsverhalten der Zellen zu untersuchen, wurden  $5 \times 10^4$  Zellen/Deckgläschen in einer 24-Loch-Schale ausgesät. Die Deckgläschen wurden zuvor mit Fibronectin (50 µg/ml), Laminin (25 µg/ml), Collagen A (0,01% in 0,01 M Essigsäure) und Poly-L-Lysin-Lösung (0,1 mg/ml) beschichtet oder es wurden unbeschichtete Deckgläschen

verwendet. Überschüssige Lösung wurde abgenommen und die Oberfläche unter UV-Licht getrocknet. 30 und 60 min nach Aussaat wurden die Zellen mit Formaldehyd fixiert und durch Tritonbehandlung permeabilisiert. Das Zell-Cytoskelett wurde mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin dargestellt, während für die Profilin I-Färbung der monoklonale Antikörper 2H11 als erster und ein anti-Maus-IgG-FITC-gekoppelter Antikörper als zweiter Antikörper eingesetzt wurden. Das Präparat wurde in Mowiol eingebettet.

Zur Ermittlung des Adhäsionsverhaltens wurden in mindestens 20 zufälligen Sehfeldern alle abgesetzten Zellen ausgezählt. Zur vergleichenden Analyse unterschiedlicher Zellklone wurde die durchschnittliche Zellzahl adhärerter Zellen pro Sehfeld berechnet.

Zur Untersuchung des Ausbreitungsverhaltens wurden die Zellen in zwei Kategorien eingeteilt (nicht-ausgebreitet und ausgebreitet) und ausgezählt. Es erfolgte eine statistische Auswertung, die das Verhältnis von abgesetzten Zellen zur totalen Zellzahl wiedergab.

#### **4.12 „Wounding assay“**

Mit Hilfe des „wounding assay“ wurde die Motilität unterschiedlicher Zelllinien untersucht. Auf verschiedenen Matrices (Fibronektin, Laminin, Collagen und Poly-L-Lysin) wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in einer 3,5 cm-Zellkulturschale ausgesät und beim Erreichen vollständiger Konfluenz wurde mittels einer 10  $\mu$ l Mikrospritze eine Wunde in den Zellrasen gezogen. Die Zellen wurden anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um die abgelösten Zellen zu entfernen. Um ein zellteilungsbedingtes Zuwachsen der Wunde zu verhindern, wurde Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid (4  $\mu$ M Endkonzentration) als Mitose-Inhibitor eingesetzt.

Die fotografische Dokumentation erfolgte am Inversmikroskop nach 24 Stunden (Axiovert 135 TV, Zeiss, Göttingen).

Die Auswertung der wieder bewachsenen Wundflächen erfolgte mit der Software MetaMorph®. Es wurde die Fläche der Wunde zu Versuchbeginn (0 h) und nach 24 Stunden bestimmt, wobei die Differenz die zugewachsene Fläche darstellt. Die Berechnung der Fläche ( $\mu\text{m}^2$ ) erfolgte über das Referenzbild eines Größenstandards.

#### **4.13 Bestimmung der Proliferationsrate**

Viele Krebszellen besitzen eine erhöhte Proliferationsrate und stellen keine hohen Anforderungen an das sie umgebende Medium, wie den Gehalt an Wachstumsfaktoren.

„Normale“ Zelllinien hingegen weisen eine reduzierte Proliferationsrate auf und reagieren mit verminderter Teilungsaktivität auf einen reduzierten Gehalt an Wachstumsfaktoren. Diese Unterschiede kann man in Wachstumskurven darstellen.

Pro 6 cm Zellkulturschale wurden  $5 \times 10^4$  Zellen einer exponentiell wachsenden Kultur ausgesät. Die Zellen wurden in DMEM mit einer reduzierten FCS-Konzentration (5%), ohne Wechsel des Mediums und ohne Zusatz von Antibiotika gehalten. Es wurde täglich bis Tag 11 die Zellzahl mit einer Neubauer-Zählkammer bestimmt und dann die Generationszeit nach folgender Formel berechnet.

Berechnung der Generationszeit (exponentielle Phase):

$$g = \frac{(t_2 - t_1) \lg 2}{\lg N_2 - \lg N_1}$$

In dieser Formel steht g für die Generationszeit, N für die Zellzahl und t für die Zeit in Stunden.

#### 4.14 Verankerungsunabhängiges Wachstum von Zellen

Krebszellen können im Gegensatz zu „normalen“ Zellen verankerungsunabhängig wachsen. Dies kann man untersuchen, in dem Zellen in Weichagar kultiviert werden. Krebszellen sind auch in dieser Umgebung in der Lage, sich zu teilen und Kolonien zu bilden, während „normale“ Zellen als Einzelzellen verbleiben.

Pro Klon wurden vier 6 cm-Zellkulturschalen mit 4 ml Grundagar befüllt. Auf dem ausgehärteten Grundagar wurden dann  $2,5 \times 10^4$  Zellen in 3,5 ml Überschichtungsagar aufgebracht. Nach dem Aushärten bei RT wurden die Zellkulturschalen 3 bis 4 Wochen bei 37°C inkubiert und schließlich die entstandenen Kolonien ausgezählt.

##### Grundagar (Menge pro 4 Schalen):

2 ml FCS  
9 ml 1,2%ige Agarose Typ VII,  
autoklaviert und bei 45°C flüssig  
gehalten  
9 ml doppelkonzentriertes DMEM

##### Überschichtungsagar:

1,5 ml FCS  
6,75 ml 0,6%ige Agarose Typ VII  
6,75 ml doppelkonzentriertes  
DMEM  
Zellsuspension ( $1,1 \times 10^5$  Zellen)

#### **4.15 Differenzierung von Zellen auf Matrigel™**

Das Anheftungs- und Differenzierungsvermögen von Zellen lässt sich durch Wachstum in oder auf Matrigel™ untersuchen. Matrigel™ Basement Membrane Matrix (BD Biosciences) wird aus dem Engelbreth-Holm-Swarm (EHS) Maussarcom extrahiert und ist in seiner Zusammensetzung der extrazellulären Matrix ähnlich. Seine Hauptkomponente ist Laminin, weitere Bestandteile sind Kollagene, Proteoglykane und Wachstumsfaktoren (Kleinman et al., 1982).

Alle Schritte wurden auf Eis durchgeführt und alle Materialien wurden auf 4°C vorgekühlt, da das Matrigel™ bei dieser Temperatur flüssig ist, während es bei 22°C anfängt, seine Konsistenz zu verändern und gelartig wird.

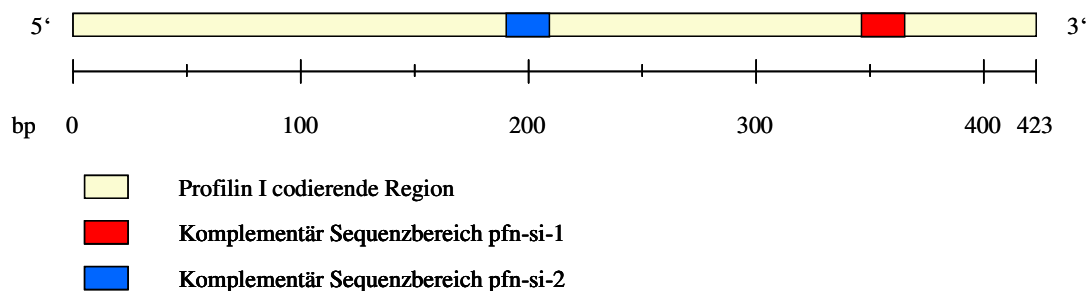
100 µl Medium ohne Zusatz von FCS wurden mit 100 µl Matrigel™ gemischt und in die Vertiefung einer 24-Loch-Platte gefüllt. Nach 30 min Inkubation bei 37°C wurden auf die Matrigelschicht  $5 \times 10^4$  Zellen in 0,5 ml Medium ausgesät. Die Zellen wurden dann bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert und anschließend fotografisch dokumentiert.

### III Ergebnisse

#### 1 „Knock down“ von Profilin I in CAL51-Zellen

Mit Hilfe der RNAi-Technologie wurde zunächst die Auswirkung des „knock down“ von Profilin I in CAL51-Zellen, einer Brustkrebszelllinie, untersucht.

Diese Methode bietet die Möglichkeit, schnell und unkompliziert die Expression eines Proteins zu unterdrücken. In einer Versuchsreihe wurden verschiedene Transfektionsreagenzien und zwei verschiedene Profilin I-spezifische siRNA-Duplices getestet. Das Reagenz RNAiFect (Qiagen) wurde für die nachfolgenden Untersuchungen ausgewählt, weil es die höchste Transfektionseffizienz besaß und gleichzeitig eine niedrige Toxizität zeigte. Die siRNA-Duplices (pfn-si-1 und pfn-si-2), die verwendet wurden, sind schematisch in Abbildung 6 dargestellt.



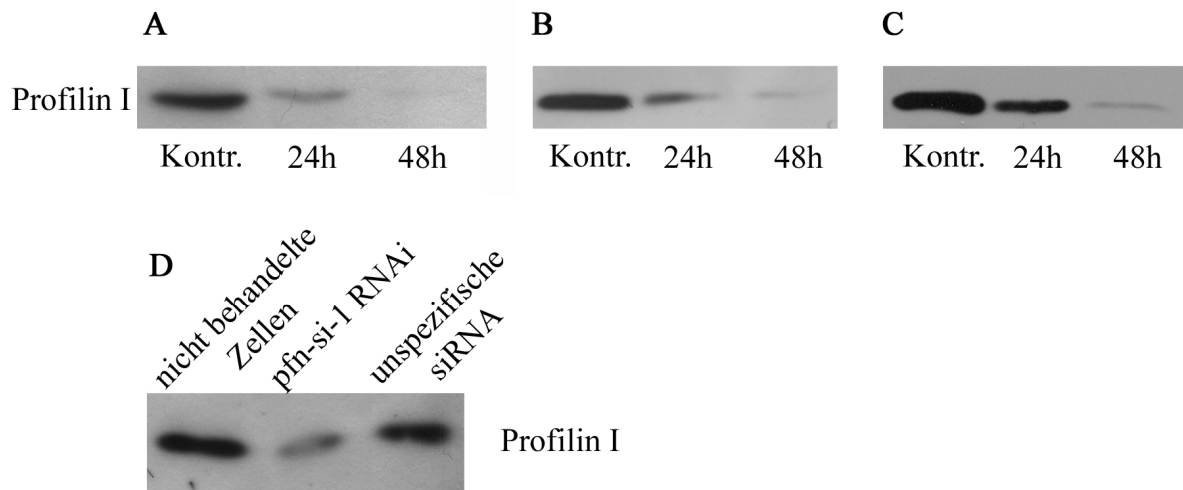
**Abb. 6: Lokalisation der siRNA-Duplices auf der Profilin I-cDNA-Sequenz.**

Der siRNA-Duplex pfn-si-1 ist komplementär zu den Basen 348 bis 367 und pfn-si-2 im Bereich der Basen 190 bis 210 der codierenden Region der Profilin-mRNA (s. Material und Methoden II.1.7).

Der siRNA-Duplex pfn-si-1 hybridisiert mit der Nukleotid-Sequenz nt = 348-367 (siehe Material und Methoden II 1.7) im 3'-Bereich der codierenden Region der Profilin-mRNA, wobei sich der komplementäre Sequenzbereich für den Duplex pfn-si-2 in der Nähe der Base 200 befindet (Abb. 6). Die Sequenz des Duplex pfn-si-1 wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. K. Weber (MPI Göttingen) nach spezifischen Algorithmen ermittelt (Elbashir et al., 2002). Der siRNA-Duplex pfn-si-2 hingegen ist ein kommerziell erhältlicher validierter siRNA-Duplex.

CAL51-Zellen wurden mit den siRNA-Duplices transfiziert. Nach einer Inkubationszeit von 24 und 48 Stunden wurden Zellextrakte hergestellt und die Gesamtproteinkonzentration mit dem Bradford-Test bestimmt. 5 µg Gesamtprotein wurden in einem SDS-Polyacrylamid-Gel

(PAA-Gel) aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulose-Membran transferiert. Mit einer Ponceau-Färbung wurde kontrolliert, dass gleiche Proteinmengen auf die Nitrozellulose-Membran transferiert wurden (Daten nicht gezeigt). Der Profilin I-Nachweis auf der Membran erfolgte mit dem spezifischen Antikörper 2H11. Als Kontrolle wurden die Zellen mit einem unspezifischen siRNA-Duplex transfiziert, der keine humane mRNA-Sequenz erkennt. Entsprechend den Erwartungen war der Profilinspiegel nach der Transfektion mit dem unspezifischen Kontroll-siRNA-Duplex nicht reduziert (Abb. 7D).



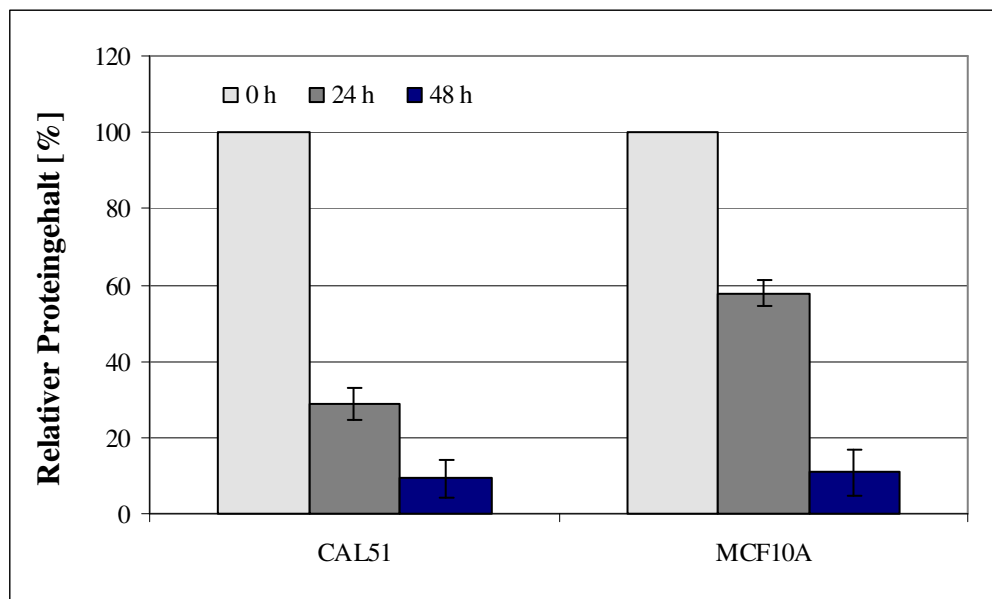
**Abb. 7: Immunblot von Zellextrakten nach Behandlung mit siRNA-Duplices.**

CAL51-Zellen wurden mit den siRNA-Duplices pfn-si-1 (A) und pfn-si-2 (B) transfiziert und die Expression des endogenen Profilin I per Immunblot bestimmt. Der Nachweis von Profilin I erfolgte mit dem spezifischen Antikörper 2H11. Als Kontroll-Zelllinie wurden MCF10A-Zellen, die mit dem siRNA-Duplex pfn-si-1 transfiziert wurden, verwendet (C). Als Nachweis der Spezifität der RNAi-Methoden wurden CAL51-Zellen zusätzlich mit einem unspezifischen siRNA-Duplex transfiziert (D). Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Es wurden jeweils 5 µg Gesamtproteinextrakt analysiert.

Der Profilin I-Gehalt der CAL51-Zellen, die mit pfn-si-1 transfiziert wurden, war schon nach 24 Stunden um 70% reduziert (Abb. 7A). Die Transfektion der Zellen mit dem siRNA-Duplex pfn-si-2 ergab ein identisches Resultat (Abb. 7B). Da aber die Sequenz des siRNA-Duplex pfn-si-1 bekannt war, wurde für die weiteren Analysen immer dieser siRNA-Duplex eingesetzt.

Der Profilin I-„knock down“ konnte auch in einer normalen Brustepithelzelllinie induziert werden. Dazu wurden MCF10A-Zellen verwendet (Abb. 7C). Die Transfektion mit dem siRNA-Duplex pfn-si-1 führte auch in diesem Fall zu einer Abnahme des Profilin Gehaltes, wobei der Proteinspiegel langsamer als bei den CAL51-Zellen reduziert wurde. Nach 24 Stunden konnten noch 58% des PFNI nachgewiesen werden.





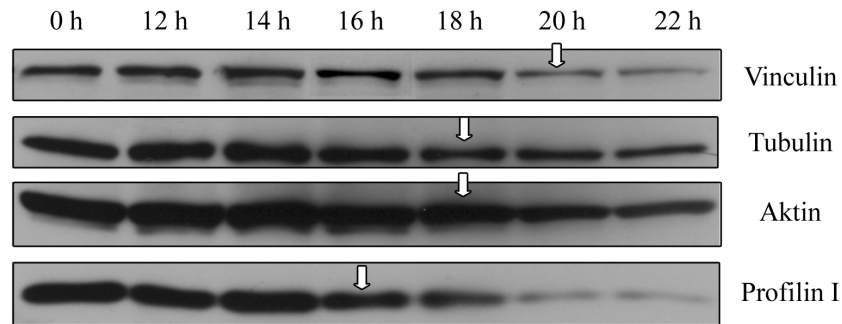
**Abb. 8: Quantifizierung des Profilingehaltes nach siRNA-induziertem „knock down“.**

Das Diagramm zeigt den Profilingehalt von CAL51- und MCF10A-Zellen nach RNAi-Behandlung. Die Blots wurden eingescannt, die Intensität der Banden wurde mit dem Programm Easywin (Herolab) vermessen und der relative Proteingehalt quantifiziert. Der Proteingehalt der jeweiligen Zelllinie wurde auf 100% gesetzt und bezieht sich auf die Analyse von 5 µg Zellextrakt. Die Standardabweichungen ergeben sich aus den Werten von fünf unabhängigen Versuchen.

Die Quantifizierung der Reduktion des Profilingehaltes erfolgte durch die Auswertung von Immunblots aus fünf unabhängigen Versuchen. Die Röntgenfilme wurden eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Computerprogramm Easywin (Herolab) analysiert.

Der Profilingehalt der CAL51-Zellen war nach 24 Stunden um durchschnittlich 71% und nach 48 Stunden um 90% vermindert (Abb. 8). Bei der Kontroll-Zelllinie MCF10A war der Profilingehalt nach 24 Stunden um 42% reduziert und nach 48 Stunden um 89%.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass Profilin I in CAL51-Zellen nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt. Aufgrund dieser Daten wurde die Reduzierung des Profilingehaltes in kleineren Schritten ermittelt.



**Abb. 9: Immunblot von CAL51-Zellextrakten nach RNAi-Behandlung in kleinen Zeitabständen.**

CAL51-Zellen wurden mit siRNA-Duplices (pfn-si-1) transfiziert, in regelmäßigen Zeitabständen nach der Transfektion wurden die Zellen abgelöst und Zellextrakte hergestellt. Der zelluläre Gehalt der Proteine Profilin I, Aktin, Tubulin und Vinculin wurde per Immunblot bestimmt. Der Nachweis von Profilin I erfolgte mit dem Antikörper 2H11, Aktin wurde mit dem Antikörper 2G2, Tubulin mit dem DM1A- und Vinculin mit dem hvin1-Antikörper identifiziert. Die Pfeile zeigen den Zeitpunkt, an dem die Reduzierung des Gehalts der Proteine im Immunblot sichtbar ist.

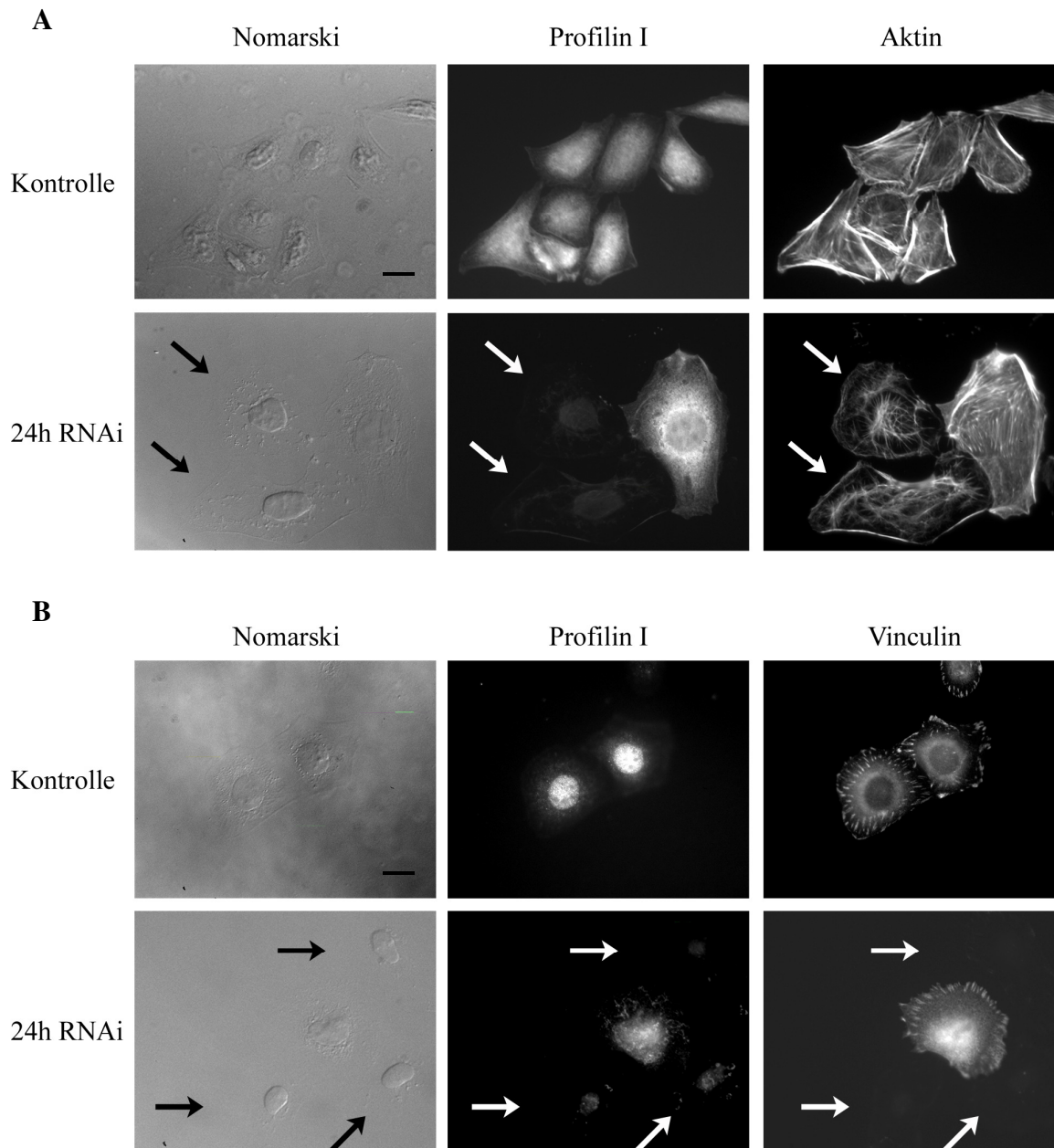
Die CAL51-Zellen wurden mit pfn-si-1 transfiziert. In regelmäßigen Zeitabständen wurden Zellextrakte hergestellt und diese im Immunblot analysiert. Bereits 16 Stunden nach der transienten Transfektion (Abb. 9) begann der Profilinspiegel zu sinken (37% weniger Protein); nach 20 Stunden konnte nur noch durchschnittlich ca. 30% des endogenen Profilin I nachgewiesen werden. Ferner war in Immunfluoreszenz-Analysen bereits 22 Stunden nach der Transfektion mit siRNA-Duplices in 40% der Zellen kein Profilin mehr nachweisbar. Berücksichtigt man, dass für die Transfektion 2 bis 4 Stunden notwendig sind, deuten diese Daten auf eine Halbwertszeit von Profilin I in diesen Zellen von höchstens 10 Stunden hin. Die genaue Ermittlung der Halbwertszeit von Profilin erfordert jedoch weitere Untersuchungen.

Die Reduzierung des Profilingehaltes führte zudem auch zum Absinken des Spiegels anderer cytoskelettaler Proteine, wie z.B. Aktin, Tubulin und Vinculin. Der Gehalt von Aktin und Tubulin begann 18 Stunden nach der Transfektion zu sinken und die Reduzierung betrug 40% für Aktin bzw. 53% für Tubulin. Der Vinculingehalt war nach 18 Stunden um 30% und nach 20 Stunden um 65% reduziert.

Der Effekt der Reduzierung von Profilin I auf das Cytoskelett wurde daraufhin mittels Immunfluoreszenz-Analysen untersucht.

Die Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, transfiziert, nach 24 Stunden fixiert, permeabilisiert und mit den entsprechenden Antikörpern bzw. Phalloidin gefärbt.

Die mit pfn-si-1 transfizierten Zellen wiesen im Vergleich zur Kontrolle einen stark reduzierten Profilinhalt auf (Abb. 10A).



**Abb. 10: Fluoreszenzmikroskopische Analyse von Zellen nach Profilin I „knock down“.**

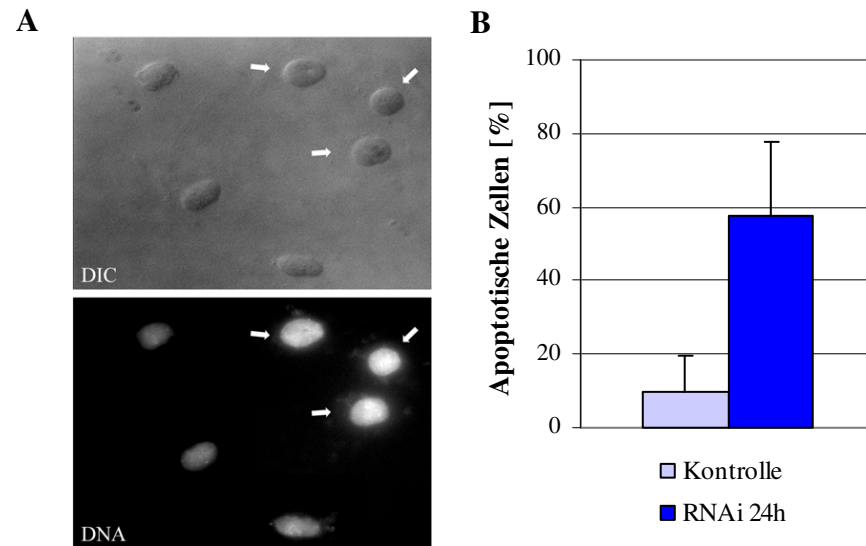
Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von CAL51-Zellen, die mit spezifischen siRNA-Duplices transfiziert wurden. (A) Die Fluoreszenzmarkierung des endogenen Profilin I erfolgte mit dem monoklonalen PFNI-Antikörper 2H11 und sekundärem Fluorescein-konjugiertem anti-Maus-IgG. Das Aktin-Cytoskelett wurde durch die Dekoration mit Rhodamin-konjugiertem Phalloidin dargestellt. In (B) wurde Profilin mit dem Kaninchen-Antiserum 361 und sekundären Rhodamin-konjugiertem anti-Kaninchen-IgG markiert. Die Vinculin-Färbung erfolgte mit dem monoklonalen Vinculin-Antikörper hvin1 und mit sekundärem Fluorescein-konjugiertem anti-Maus-IgG. Die Reduzierung von Profilin I ist in den mit Pfeilen gekennzeichneten Zellen zu erkennen. Der Balken entspricht 10 µm.

Die Darstellung des Aktin-Cytoskeletts zeigte, dass die mit RNAi behandelten Zellen weniger Aktinfilamente besaßen und dass die Adhäsionsgürtel, verglichen mit der Kontrolle, nicht so stark ausgebildet waren (Abb. 10A). In Profilin-defizienten Zellen konnte zudem sowohl im Cytoplasma als auch in den fokalen Kontakten ein stark reduzierter Vinculin-Gehalt nachgewiesen werden (Abb. 10B). Die Analyse der Morphologie ergab keinen Unterschied in der Form und der äußeren Gestalt transfizierter und nicht transfizierter Zellen. Hingegen erschienen alle Zellkerne der transfizierten Zellen im Vergleich zu denen der nicht transfizierten Zellen kleiner und kompakter (Abb. 10).

Eine Kultivierung der Zellen für einen Zeitraum von mehr als 48 Stunden nach der Transfektion mit siRNA-Duplices war nicht möglich. Die Anzahl der Zellen nahm deutlich ab und die Morphologie veränderte sich stark. Es bildeten sich viele Blasen im Bereich der Zellmembran und die Zellen verkleinerten sich. Weiterhin waren die Zellkerne unförmig. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde untersucht, ob die Zellen, die durch die RNAi-Behandlung einen reduzierten Profiliningehalt aufwiesen, noch lebensfähig waren, oder ob sie in die Apoptose eintraten.

Die Apoptoserate der Zellen wurde mit dem „TUNEL assay“ bestimmt. Die DNA-Strang-Brüche, die beim apoptotischen Prozess entstehen, können durch den Einbau von Fluorochrom-markierten Nukleotiden (dUTP-FITC) im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden.

Die Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit siRNA-Duplices fixiert und angefärbt, anschließend wurden die Präparate analysiert. Die apoptotischen Zellen konnten von den nicht-apoptotischen Zellen anhand eines stark fluoreszierenden Zellkerns unterschieden werden (Abb. 11A). Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz RNAiFect inkubiert, da die Untersuchungen mit nicht-spezifischer siRNA schon gezeigt hatten, dass dieser Duplex keinen Einfluss auf den Profiliningehalt hatte (Abb. 7D). Die Reagenzien, die für die RNAi-Transfektion verwendet werden, können cytotoxisch auf die Zellen wirken und selbst Apoptose induzieren (Spagnou et al., 2004). Die Apoptoserate der CAL51-Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert wurden, lag bei 12%.



**Abb. 11: Apoptose nach siRNA-Transfektion.**

Die RNAi-behandelten CAL51-Zellen wurden 24 Stunden nach der Transfektion mit einer 4%igen FA-Lösung fixiert, permeabilisiert und gefärbt. (A) Die apoptotischen Zellen zeigten einen stark fluoreszierenden Zellkern, angefärbt mit fluoreszenzmarkierten Nukleotiden (dUTP-FITC). (B) Die Bestimmung des Anteils an apoptotischen Zellen wurde mikroskopisch durchgeführt. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert.

Die Grafik spiegelt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wider. Es wurden jeweils mind. 200 Zellen pro Ansatz ausgewertet.

24 Stunden nach der RNAi-Behandlung war im Vergleich zur Kontrolle ein statistisch höherer Anteil der Zellen apoptotisch. 58% der Zellen zeigten als Zeichen für den programmierten Zelltod einen stark fluoreszierenden Zellkern. Diese hohe Apoptoserate deutet darauf hin, dass CAL51-Zellen, die keinen oder nur einen geringen Anteil an Profilin aufweisen, nicht in der Lage sind zu überleben, und dass Profilin I auch in kultivierten Zellen ein essentielles Protein ist.



Weiterhin wurde die Basen-Sequenz für humane Zellen optimiert. In dem Bereich, in dem pfn-si-1 mit der mRNA interagieren sollte, wurden diesmal 4 Basen ausgetauscht. Die Verwendung dieser synthetisch hergestellten, modifizierten Gene bot noch andere Vorteile im Vergleich zu der zuerst getesteten cDNA. Sie gab die Möglichkeit, verschiedene siRNA-Duplices zu testen oder Vektor-basierte RNAi-Methoden zu verwenden. Zusätzlich ermöglichte der Einsatz dieser synthetischen cDNAs eine separate Quantifizierung der endogenen und der rekombinanten Profilin-mRNA mittels „Real Time“-PCR.

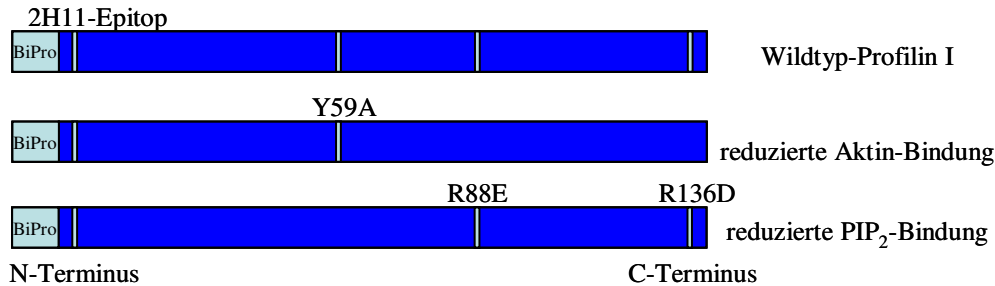
Die synthetischen cDNAs codierten für Wildtyp-Profilin, das als Kontrolle eingesetzt wurde, für die Mutante PFNI/Y59A (PFNI/AD), die eine sehr niedrige Affinität für Aktin besitzt (Schlüter et al., 1998), und für eine PIP<sub>2</sub>-Bindungsmutante. PIP<sub>2</sub> interagiert mit Profilin in zwei Regionen. Daher wurde in dieser Arbeit die Doppelmutante PFNI/R88E-R136D (PFNI/LD) benutzt, bei der die Affinität für PIP<sub>2</sub> in beiden Bindungsmotiven stark reduziert ist (Lambrechts et al., 2002; Skare und Karlsson, 2002). Wittenmayer und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass CAL51-Zellen, die ein Profilin mit einer reduzierten Affinität zu Poly-L-Prolin-Liganden exprimieren, ein identisches Verhalten wie die Zellen des PFNI/WT-Klons aufwiesen. Aufgrund dieses Befunds wurde die Poly-L-Prolin-Bindungsmutante des Profilins in dieser Arbeit nicht eingesetzt.

Die modifizierten cDNAs codierten in der 5'-Region für das BiPro-Epitop-tag (Abb. 13), hingegen wurde das Epitop für den Profilin I-spezifischen Antikörper 2H11 durch den Austausch des Asparagin- durch einen Serinrest in der Position 9 eliminiert. Diese Substitution entspricht der Aminosäuresequenz von Maus-Profilin I, das nicht vom 2H11-Antikörper erkannt wird (Mayboroda et al., 1997). Dieser Austausch ermöglichte eine Unterscheidung zwischen endogenem und rekombinantem Profilin im Immunblot und in der Immunfluoreszenz.

Alle cDNAs wurden in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 kloniert, welcher das Neomycin-Phosphotransferase-Gen trägt. Dieses Resistenz-Gen ermöglicht die Selektion stabil transfizierter Zellklone mit dem Aminoglykosidantibiotikum Geneticin (G418), das durch die Bindung an die 80S-Ribosomen die Proteinbiosynthese eukaryontischer Zellen blockiert. Die Zelllinie CAL51 wurde mit den entsprechenden Plasmiden transfiziert. Nach dreiwöchiger Selektion wurden Zellklone isoliert und auf die Expression der BiPro-markierten rekombinanten Profile im Immunblot analysiert. Für jede Profilinmutante wurden 30 bis 40 Klone isoliert, von denen etwa 25% eine Expression der exogenen BiPro-

tag-markierten Profiline zeigten. Zur nachfolgenden Charakterisierung wurden jeweils drei Klone ausgewählt, die das rekombinante Protein exprimierten.

Eine Ausnahme stellte das PFNI/LD-Derivat dar. Trotz mehrfacher Ansätze konnte nur ein einziger Klon isoliert werden, der eine stabile Expression des Profilins mit einer reduzierten Affinität für  $\text{PIP}_2$  besaß.



**Abb. 13: Schematische Darstellung der verwendeten cDNA.**

Neben der humanen modifizierten Profilin I-cDNA wurden zwei Profilinmutanten für die stabile Transfektion verwendet. In allen Profilinen wurde das Epitop für den Profilin I-spezifischen Antikörper 2H11 durch den Austausch des Asparagin- durch einen Serinrest in der Position 9 eliminiert. N-terminal wurden die cDNAs mit dem Epitop-tag des Antikörpers 4A6 (BiPro-tag) fusioniert und in den eukaryontischen Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) kloniert. Die Mutante PFNI/Y59A (PFNI/AD) weist im Vergleich zum Wildtyp-Profilin eine verringerte Affinität gegenüber Aktin auf (Schlüter et al., 1998), die Mutante PFNI/R88E-R136D (PFNI/LD) besitzt eine reduzierte Bindung an  $\text{PIP}_2$  (Skare und Karlsson, 2002; Lambrechts et al., 2002).

## 2.1 Quantifizierung des Profilin I-Gehaltes in den stabilen Zellklonen

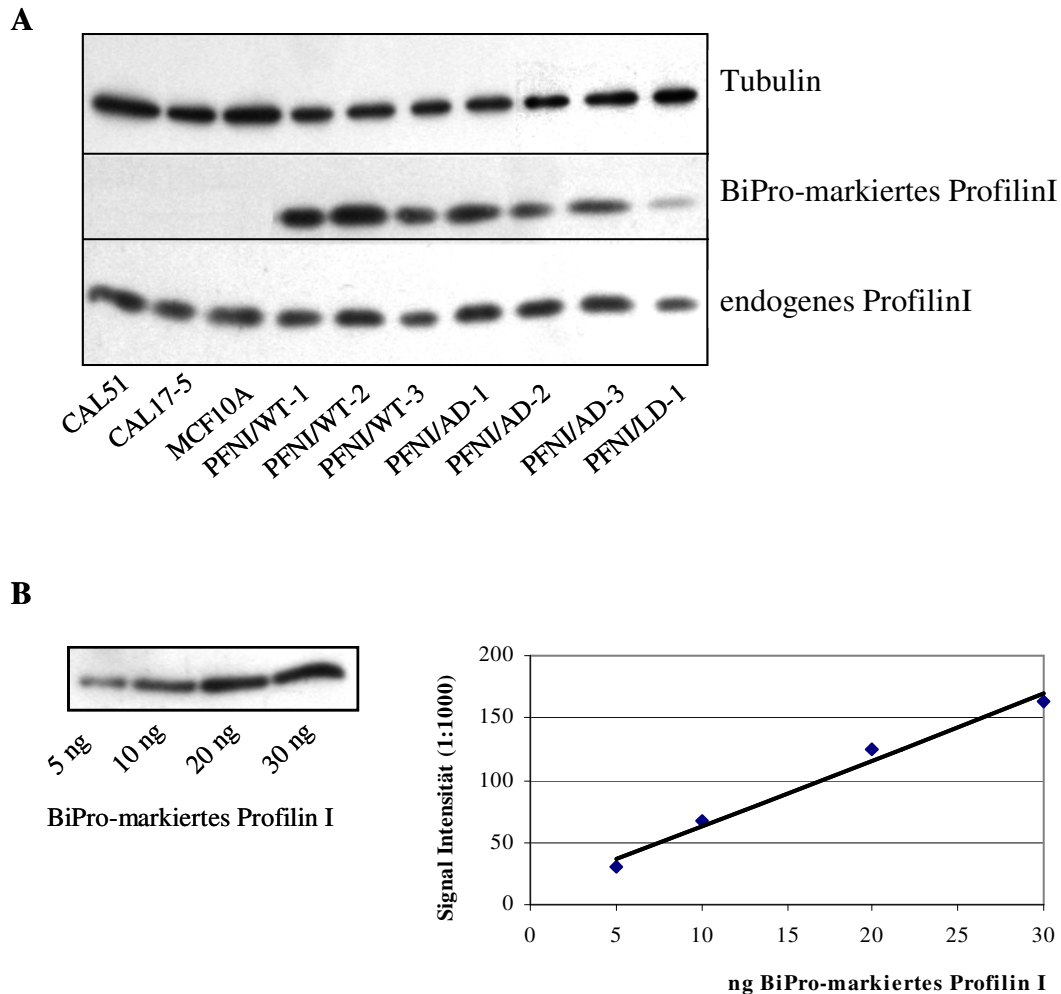
Zur Charakterisierung der Klone wurde zunächst der Profilin I-Expressionsspiegel in den erzeugten stabilen CAL51-Derivaten bestimmt. Aufgrund des fusionierten BiPro-Epitop-tags konnte die Expression des endogenen Profilins separat von exogenem Profilin im Westernblot quantifiziert werden.

Gleiche Gesamtproteinmengen (5 bis 10  $\mu\text{g}$ ) wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und im Immunblot mit Hilfe des Profilin I-spezifischen Antikörpers 2H11 bzw. des BiPro-tag-spezifischen Antikörpers 4A6 analysiert (Abb. 14A). Für die Quantifizierung der Profilinexpression wurde jeweils eine Profilin-Eichreihe aufgetragen, entweder rekombinantes WT-PFNI oder BiPro-markiertes Profilin I.

Nach der ECL-Entwicklung wurden die Protein-Banden densitometrisch vermessen und mit dem Computerprogramm Easywin (Herolab) quantitativ ausgewertet. Mit Hilfe des Profilin-Standards (Abb. 14B) wurde eine Eichgerade erstellt und der Profilingehalt in den



Zellextrakten berechnet. Zur Standardisierung des Westernblots wurde als Referenz das Protein Tubulin verwendet.

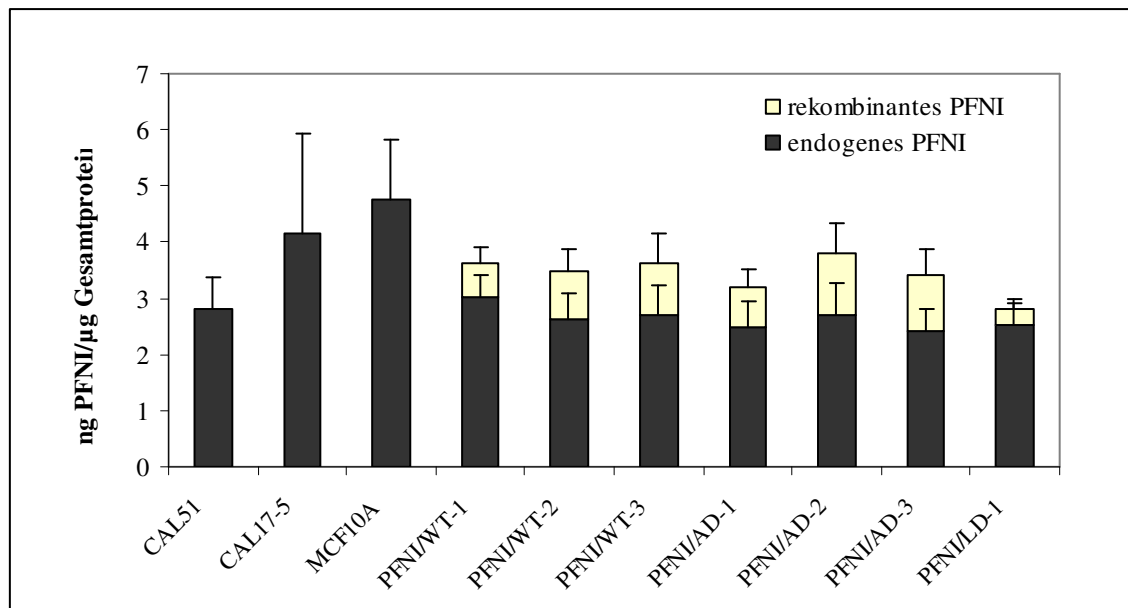


**Abb. 14: Endogene und rekombinante Profilin I-Expression in den stabilen CAL51-Zellklonen.**

CAL51-Zellen wurden stabil mit BiPro-markiertem Profilin I und den zwei Profilin I-Mutanten PFNI/AD und PFNI/LD transfiziert, Zellklone generiert und die Expressionsstärke des endogenen und des rekombinanten Profilins im Immunblot bestimmt. (A) Der Nachweis des endogenen Profilins erfolgte mit dem Antikörper 2H11, während das rekombinante Profilin mit dem anti-BiPro-Antikörper 4A6 nachgewiesen wurde. Der Nachweis von Tubulin mit dem Antikörper DM1A diente als Ladungskontrolle. (B) Für die quantitative Analyse der Expressionsspiegel wurde ein Profilin-Standard mit rekombinantem Protein aufgetragen. Der lineare Bereich für beide Antikörper liegt zwischen 5 ng und 30 ng Protein. Eine Eichgerade wurde erstellt und über die Geradengleichung konnten die Expressionsstärken ermittelt werden.

Es wurden pro Zelllinie mindestens acht Immunblots mit Zellextrakten aus unterschiedlichen Passagen und unterschiedlichen Aufarbeitungen ausgewertet, um die Profilinexpression zu quantifizieren. Die Zellklone wurden in Kultur unter dem Selektionsantibiotikum G418 bis zu zwölf Wochen weiterkultiviert. Die Selektion und die lange Kultivierungszeit beeinflussten

nicht die Expression des rekombinanten Profilins. Dies ist ein Hinweis darauf, dass die CAL51-Zellklone die entsprechenden cDNAs in ihr Genom integriert hatten und die rekombinanten Proteine stabil exprimierten. Die Ausgangszelllinie CAL51 und die Kontroll-Zelllinien MCF10A und CAL17-5 zeigten bei Verwendung des anti-BiPro-Antikörpers 4A6 kein Signal (Abb. 14A und 15).



**Abb. 15: Profilinexpression der CAL51-Zellklone.**

Die im Immunblot quantitativ ermittelten Profilinexpressionsspiegel sind gezeigt. Die grauen Balken dokumentieren den endogenen Profilin Gehalt, die gelben Balken den rekombinanten Profilinanteil. Die Brustepithelzelllinie MCF10A hat im Vergleich zur Brustkrebszelllinie CAL51 einen ca. 1,7-fachen höheren Profilin I-Gehalt. Die Standardabweichungen ergeben sich aus mindestens acht ermittelten Werten.

Die Brustkrebszelllinie CAL51 wies im Vergleich zur normalen Brustepithelzelllinie MCF10A 40% und zu CAL17-5-Zellen 34% weniger Profilin auf.

Der Gesamtprofilin Gehalt in den generierten Zellklonen wurde durch die Expression des rekombinanten Profilins um 12% bis 42% im Vergleich zum endogenen Profilin Gehalt erhöht (Tab. 8). Für die Profilinmutanten PFNI/AD (Aktinbindungsmutante) ergab sich ein Gesamtprofilin Gehalt, der dem 1,3- bis 1,4-fachen Profilin Gehalt der Krebszelllinie entsprach. Der Klon, der die PIP<sub>2</sub>-Mutante (PFNI/LD) des Profilins exprimierte, wies nur eine 12%ige Erhöhung des Profilin Gehaltes und somit eine deutlich niedrigere Expression, verglichen mit den anderen Derivaten, auf. Für die Klone, die das Wildtyp-Profilin exprimieren, ergab sich ein Gesamtprofilin Gehalt, der dem 1,2- bis 1,3-fachen des endogenen Gehaltes entsprach.

Alle generierten CAL51-Zellklone zeigten damit eine moderate Überexpression der exogenen Profiline, wie es schon in früheren Arbeiten beschrieben wurde (Wittenmayer et al., 2004; Roy und Jacobson, 2004).

**Tab. 8:** Expression von Profilin I in den verschiedenen Zellklonen

Klon	ng endogenes PFNI/ $\mu$ g Gesamtprotein	ng BiProPFNI/ $\mu$ g Gesamtprotein	Erhöhung des Profilin I-Spiegels [%]
CAL51	2,8		
CAL17-5	4,2		
MCF10A	4,7		
PFNI/WT-1	3,0	0,6	20,2
PFNI/WT-2	2,6	0,9	33,5
PFNI/WT-3	2,7	1,0	33,5
PFNI/AD-1	2,5	0,7	28,6
PFNI/AD-2	2,7	1,1	41,1
PFNI/AD-3	2,4	1,0	42,1
PFNI/LD-1	2,5	0,3	11,9

## 2.2 Analyse der Morphologie der CAL51-Zellklone

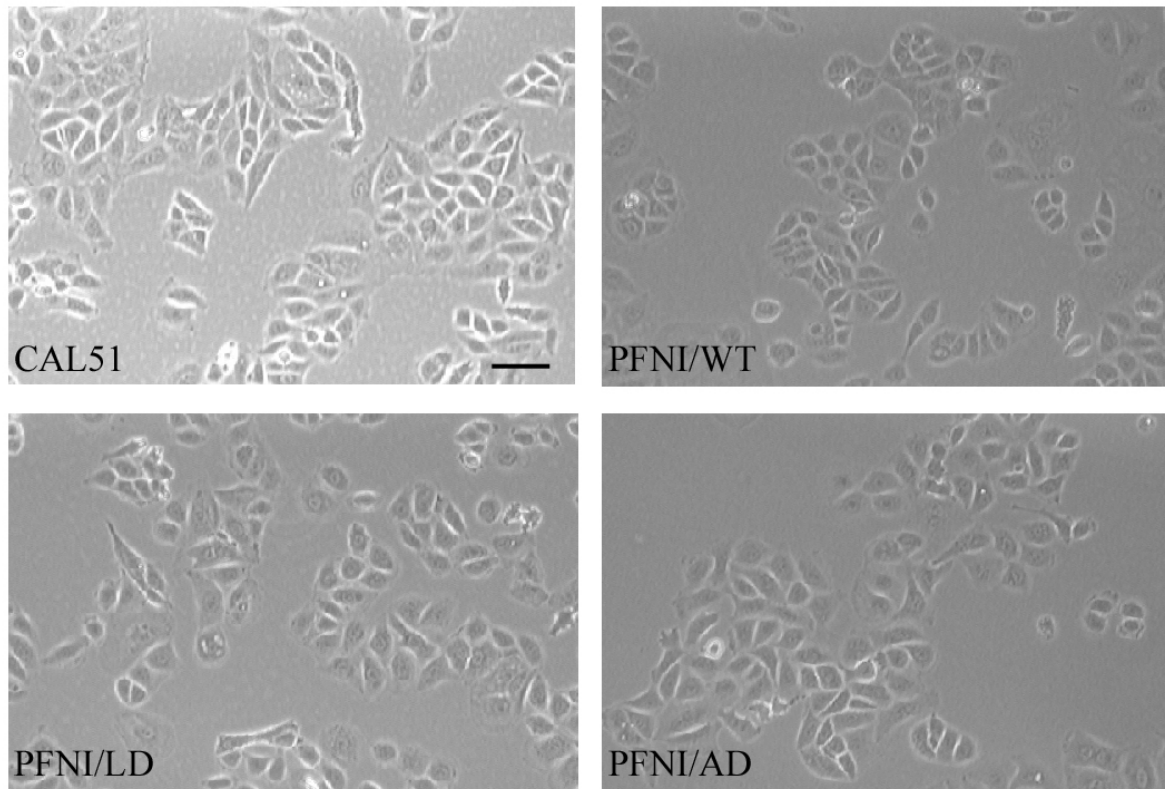
Die RNAi-Behandlung von CAL51-Zellen führte zu Veränderungen in der Morphologie der Zellen. Daher war es wichtig, die Morphologie der Klone zu analysieren, um Unterschiede bei weiteren Transfektionsversuchen zu erkennen. Weiterhin könnte sich die Morphologie der Zellderivate aufgrund der Integration von Fremd-DNA in das Genom und die anschließende Selektion mit Antibiotika verändern.

$2 \times 10^5$  Zellen wurden in einer 10 cm-Zellkulturschale ausgesät und drei Tage lang kultiviert. Anschließend folgte die fotografische Dokumentation am Inversmikroskop. Die Abbildung 16 dokumentiert die Morphologie der CAL51-Zellen und der Zellklone.

Die CAL51-Zellen wuchsen in Zellverbänden und nur selten konnten einzeln liegende Zellen beobachtet werden.

Eine ähnliche Morphologie konnte bei allen Zellklonen gezeigt werden. Die Zellen wuchsen in inselartigen Gruppen und nur gelegentlich wurden einzeln liegende Zellen beobachtet.

Daher führten die Expression des rekombinanten Profilins und die Selektion mit Antibiotika zu keinen morphologischen Änderungen im Vergleich zu den CAL51-Zellen.



**Abb. 16: Morphologie der CAL51-Zellklone.**

Gleiche Zellzahlen von CAL51-Zellen, sowie der Profilin I-, PFNI/AD- und PFNI/LD-transfizierten Zelllinien wurden ausgesät, die Zellen drei Tage kultiviert und anschließend fotografisch dokumentiert. Die Aufnahmen wurden mit 10-facher Vergrößerung erstellt. Der Balken entspricht 50 µm.

### 2.3 Untersuchung der Proliferationsrate der CAL51-Zellklone

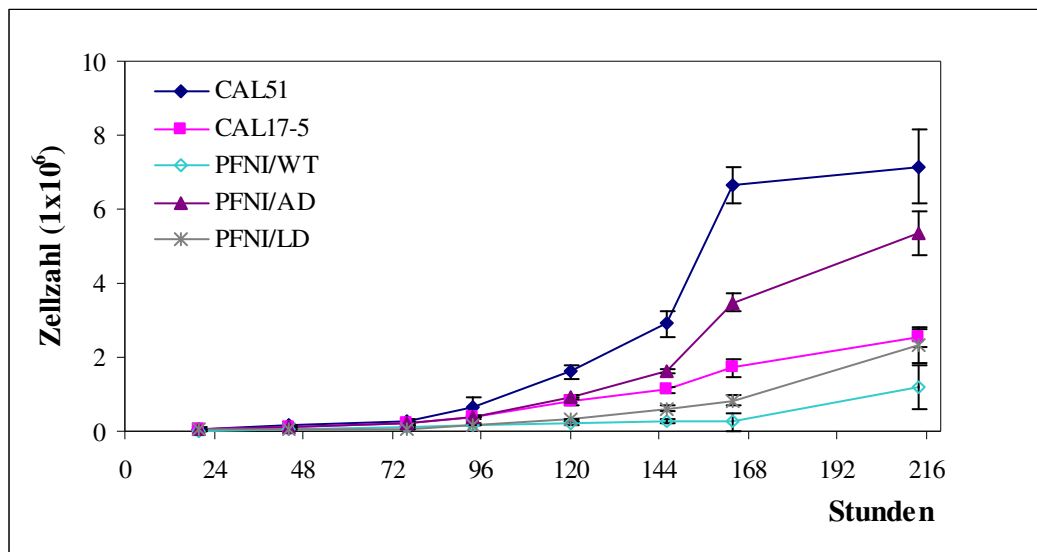
Eine Erhöhung des Profilinspiegels in CAL51-Zellen durch Wildtyp-Profilin I, wie schon in der vorherigen Studie von Janke et al. (2000) gezeigt, führt zu einer Reduzierung der Proliferationsrate. Ebenfalls zu einer reduzierten Proliferationsrate führt die Anhebung des Profilingehaltes durch die stabile Expression von Profilinmutanten (Wittenmayer, 2003).

Da verlängerte Generationszeiten bei der Auswertung von Versuchen, die über einen längeren Zeitraum verlaufen, berücksichtigt werden müssten, wurde kontrolliert, ob die generierten Zellklone veränderte Generationszeiten besaßen.

Die Proliferationsrate der charakterisierten CAL51-Zellklonen wurde mit Hilfe von Wachstumskurven ermittelt.

Dem Medium wurde nur 5% FCS zugesetzt, so dass ein reduziertes Angebot an Wachstumsfaktoren zur Verfügung stand. Die Unterschiede in der Proliferation konnten somit deutlicher hervorgehoben werden (Theile et al., 1995).

$2 \times 10^4$  Zellen pro Klon wurden auf 3,5 cm-Zellkulturschalen ausgesät und über 9 Tage erfolgte täglich die Bestimmung der Zellzahl. In Abbildung 17 sind die Wachstumskurven der Kontrolle und exemplarisch von jedem Klon dargestellt.



**Abb. 17: Wachstumskurven der CAL51-Zellklone.**

Das Wachstumsverhalten der Zellderivate wurde mit dem Proliferationsassay untersucht. Der Versuch wurde mit der genuine Zelllinie CAL51, dem Zellderivat CAL17-5 und CAL51-Zellklonen, die mit der Profilin I-cDNA und mit mutierten Profilin I-cDNAs (PFNI/AD, PFNI/LD) stabil transfiziert wurden, durchgeführt. Pro Mutante ist jeweils eine Wachstumskurve von einem Zellklon dargestellt. Die Wachstumskurven wurden über einen Zeitraum von neun Tagen gemessen. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Die Wachstumskurven ergaben unterschiedliche Generationszeiten für die stabilen Zelllinien und die genuine Zelllinie CAL51 (Tab. 9).

Die Krebszelllinie CAL51 besaß eine hohe Proliferationsrate und wuchs von allen untersuchten Zellen am schnellsten (Abb. 17). Die Expression von Wildtyp-Profilin und der PIP<sub>2</sub>-Bindungsmutante in CAL51-Zellen führte hingegen zu einer deutlichen Reduktion des Wachstums. Dies spiegelte sich in den Generationszeiten der Zellen wider: Zellklone, welche diese Mutante bzw. das Wildtyp-Profilin exprimierten, wiesen Generationszeiten von 27 bis 32 Stunden auf. Hingegen besaßen die genuine CAL51-Zellen eine Generationszeit von 23,6

Stunden. Eine Ausnahme stellte der Klon PFNI/WT-3 dar. Dieser Klon zeigte mit 22,2 Stunden eine Generationszeit, die ähnlich war wie die der genuinen CAL51-Zellen.

Als Kontrolle wurde das CAL17-5-Zellderivat verwendet, das einen 1,6-fach höheren PFNI-Expressionsspiegel im Vergleich zu CAL51-Zellen besitzt. Auch dieses Derivat zeigte eine längere Generationszeit (31,2 Stunden) im Vergleich zur Ausgangszelllinie.

Die Expression des AD-Profilins führte teilweise zu einer Reduktion des Wachstums, aber nicht in dem Maße wie die Expression von WT-Profilin oder von PFNI/LD. Die Generationszeiten der Klone, die PFNI/AD exprimieren, betrugen 23,2 bis 25,5 Stunden.

Die hier gewonnenen Resultate sind mit früheren Daten von Wittenmayer (2003) vergleichbar.

**Tab. 9:** Generationszeiten der CAL51-Zellklone

<b>Zellkon</b>	<b>Generationszeit (Stunden <math>\pm</math> SD)</b>
CAL51	23,6 $\pm$ 2,8
CAL17-5	31,2 $\pm$ 4,9
PFNI/WT-1	32,3 $\pm$ 10,0
PFNI/WT-2	32,1 $\pm$ 5,4
PFNIWT-3	22,2 $\pm$ 1,1
PFNI/LD-1	27,2 $\pm$ 2,7
PFNI/AD-1	24,9 $\pm$ 5,1
PFNI/AD-2	25,5 $\pm$ 3,1
PFNI/AD-3	23,2 $\pm$ 2,1

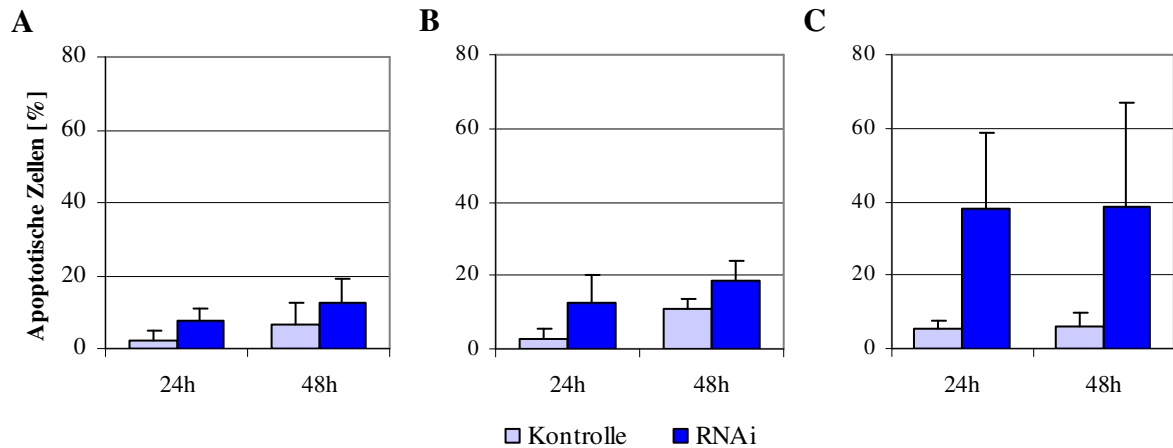
SD: Standardabweichung

### **3 Analyse des Profilin I-Expressionspiegels der Zellklone nach RNAi-Behandlung**

Die RNAi-Behandlung von genuinen CAL51-Zellen führte bereits 24 Stunden nach der Transfektion mit siRNA-Duplices zu einer hohen Apoptoserate (Abb. 11B). Deshalb wurde zunächst untersucht, ob die Expression von PFNI/WT, von PFNI/LD und von PFNI/AD nach „knock down“ des endogenen Profilins einen „rescue“-Effekt induzieren und die Apoptose supprimieren konnte. Die Zellderivate wurden auf Deckgläschen ausgesät und mit siRNA-Duplices transfiziert, nach 24 bzw. 48 Stunden wurde mittels „TUNEL assay“ die Apoptoserate ermittelt.

Die Klone, die PFNI/WT und PFNI/LD exprimieren, zeigten 24 und 48 Stunden nach RNAi-Behandlung eine Apoptoserate, die nur wenig über der der Kontrolle lag (Abb. 18A und 18B). Die Zellen konnten überleben und weiter proliferieren. Hingegen konnte eine deutliche Erhöhung der Apoptoserate bei dem PFNI/AD-Klon gezeigt werden. 24 bis 48 Stunden nach der Transfektion waren im Mittel 40% der Zellen, die die Aktin-Bindungsmutante des Profilins exprimieren, bereits apoptotisch, während bei der Kontrolle der Anteil apoptotischer Zellen nur bei 5% bis 8% lag (Abb. 18C). Damit ist der Anteil an apoptotischen Zellen deutlich höher als bei der Kontrolle, aber genauso hoch wie bei den CAL51-Zellen (t-test,  $p > 0,5$ ) (Abb. 11B).

Die Bestimmung der Apoptoserate von zwei weiteren charakterisierten PFNI/AD-Klonen zeigte ähnliche Resultate. Ein „rescue“-Effekt fand nicht statt und daher konnten mit diesen Klonen die geplanten Untersuchungen nicht durchgeführt werden, da eine Analyse der Eigenschaften von Zellen, die ausschließlich PFNI/AD exprimieren, nicht möglich ist. Weitere Versuche wurden nur mit den Klonen unternommen, die Wildtyp-Profilin und die PIP<sub>2</sub>-Bindungsmutante von Profilin exprimieren. Für die weiteren Analysen wurde der Klon PFNI/WT-2 ausgewählt, welcher die höchste Expressionsrate des rekombinanten Proteins zeigte und die niedrigste Proliferationsrate besaß.



**Abb. 18: Bestimmung der Apoptoserate nach „knock down“ des endogenen Profilin I.**

Die mit siRNA-Duplices transfizierten CAL51-Zellklone, die das Wildtyp-Profilin (A), die PIP<sub>2</sub>-Bindungsmutante (B) und die Aktin-Bindungsmutante (C) von Profilin I exprimieren, wurden 24 und 48 Stunden nach der Transfektion mit einer 4%igen FA-Lösung fixiert, mit 0,2% Triton X-100 permeabilisiert und anschließend gefärbt, um den Anteil an apoptotischen Zellen zu quantifizieren. Die Bestimmung der Apoptoserate wurde mikroskopisch durchgeführt. Bei der Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert.

Die Grafik spiegelt die Ergebnisse aus drei unabhängigen Versuchen wider. Es wurden jeweils mind. 200 Zellen pro Ansatz ausgezählt. Die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar. Die Daten wurden statistisch ausgewertet (t-test,  $p < 0,05$ ).

Weiterhin wurde der endogene Profilin Gehalt in den generierten Zellklonen mittels RNAi-Technologie reduziert und der Expressionspiegel sowohl des rekombinanten als auch des endogenen Profilins analysiert. Die Expression der rekombinanten, modifizierten Profileine sollte dabei nicht beeinflusst werden.

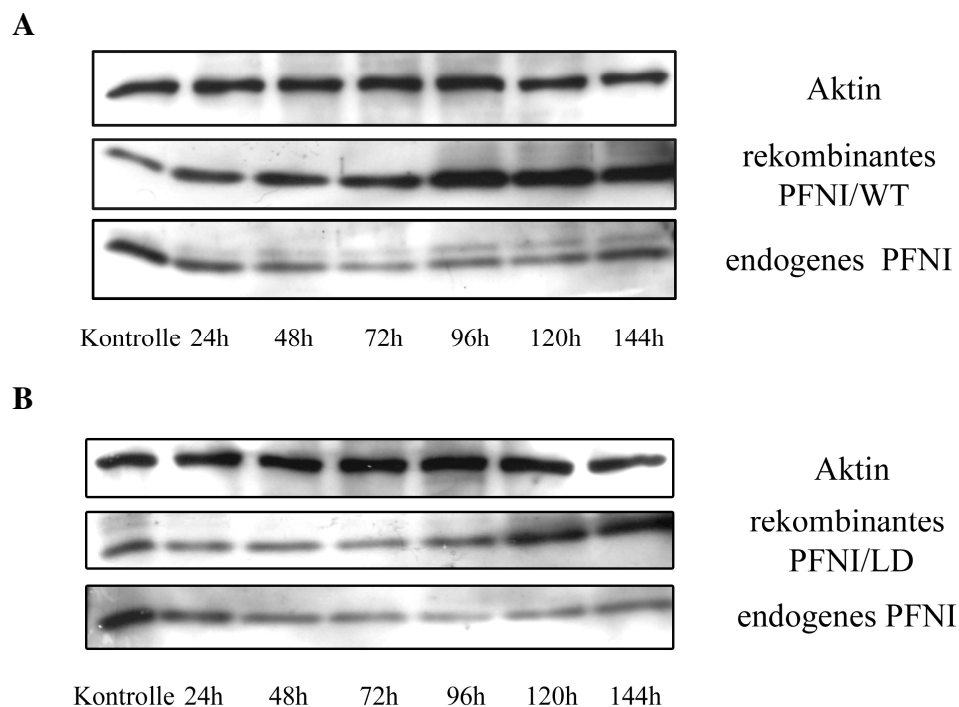
Die Expression sowohl des endogenen als auch des rekombinanten Proteins der Klone wurde eine Woche lang im Immunblot verfolgt. Untersuchungen, die über 144 Stunden hinausgingen, waren aus technischen Gründen nicht möglich, da die Zellen bereits konfluent waren. Eine Umsetzung der Zellen wurde nicht unternommen, weil dies zu einer Selektion von Zellen z.B. mit einer höheren Proliferationsrate oder mit veränderten Adhäsionsfähigkeiten geführt hätte. Somit wären die umgesetzten Zellen nicht mehr für die ganze Zellpopulation repräsentativ gewesen.

Für die Expressionsanalyse wurden 2,5 bis  $5 \times 10^4$  Zellen in der Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät, 24 Stunden später mit siRNA-Duplices transfiziert und anschließend eine



Woche lang kultiviert, wobei jeweils alle 24 Stunden Zellextrakte hergestellt und analysiert wurden.

Der PFNI/WT-exprimierende Klon zeigte 24 Stunden nach RNAi-Behandlung eine Absenkung des endogenen Proteingehaltes um 38%. Der endogene Profilengehalt sank leicht weiter bis zu einem Minimum von durchschnittlich 50% zum Zeitpunkt  $t = 72$  Stunden. Bei den genuinen CAL51-Zellen wurde allerdings nach 24 Stunden eine Abnahme des Profilengehaltes bis zu 70% nachgewiesen. 120 Stunden nach der Transfektion mit siRNA-Duplicates begann der endogene Profilinspiegel wieder zu steigen (Abb. 19A).

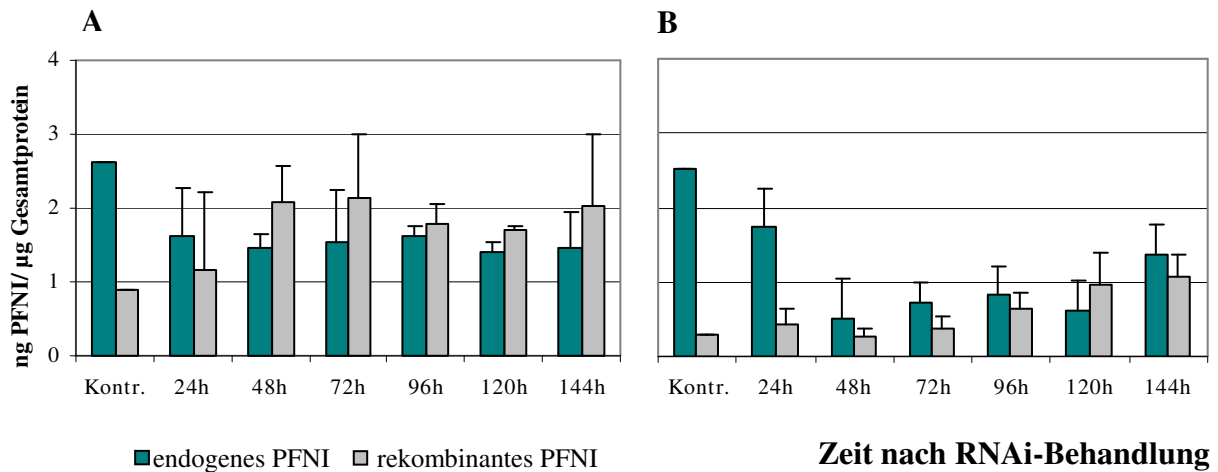


**Abb. 19: „Knock down“ des endogenen Profilin I in den Zellklonen.**

Die stabilen Zellklone wurden mit siRNA-Duplicates transfiziert und der Verlauf des „knock down“ wurde über 6 Tage im Immunblot verfolgt. Der Nachweis des endogenen Profilins erfolgte mit dem monoklonalen Antikörper 2H11, das rekombinante Protein wurde mit dem monoklonalen 4A6 dargestellt und Aktin mit dem monoklonalen Antikörper 2G2. In der Abbildung sind der Verlauf der Reaktion für den PFNI/WT-Klon (A) und für den PFNI/LD-Klon (B) gezeigt. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert.

Der Aktiningehalt blieb in dem untersuchten Zeitraum unverändert. Dabei konnte schon 24 Stunden nach der siRNA-Transfektion eine unerwartete Erhöhung des Spiegels des exogenen Profilins beobachtet werden, der bis zum 2,4-fachen des Ausgangswertes betrug (Abb. 20A). 48 Stunden nach der Transfektion war der Gesamtprofilengehalt im PFNI/WT-Klon genauso hoch wie bei den Kontroll-Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert wurden.

Die Reduzierung des endogenen Profilins wurde durch einen höheren Gehalt an rekombinantem Protein kompensiert. Der Gesamtprofilinhalt in den Zellen blieb über die gesamte Dauer des Versuches nahezu konstant (Abb. 21A).

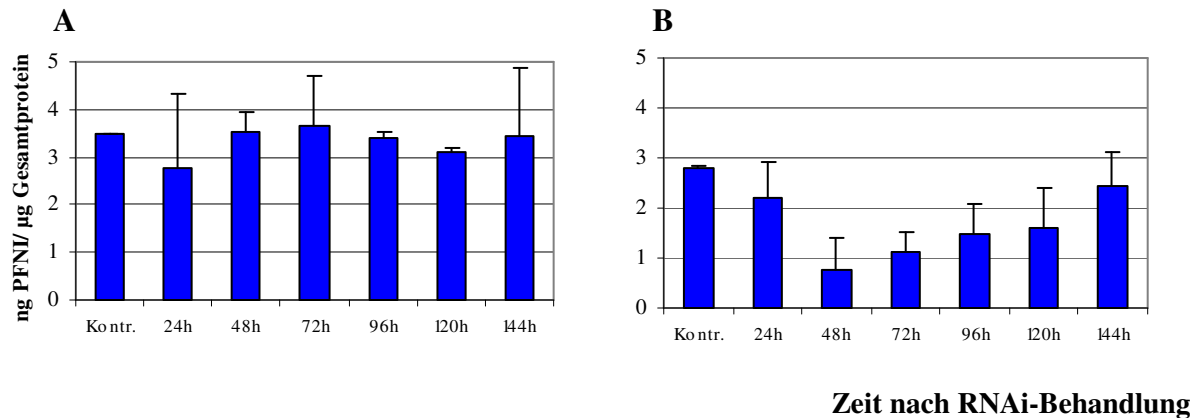


**Abb. 20: Quantifizierung des Profilinhalt der Zellkone nach RNAi-Behandlung.**

In den Diagrammen ist die Quantifizierung des Gehaltes des endogenen und des rekombinanten Profilins nach RNAi-Behandlung dargestellt. In A ist die Profilinmenge des PFNI/WT-Klones und in B die des PFNI/LD-Klones gezeigt. Die Blots aus drei unabhängigen Versuchen wurden eingescannt und die Intensität der Banden mit dem Programm Easywin (Herolab) vermessen. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Die Grafiken zeigen die Mittelwerte der drei Versuche, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Der PFNI/LD-Klon wies im Vergleich zum Wildtyp-Klon eine verzögerte Abnahme des endogenen Profilinhalt auf (Abb. 19B). Eine Reduzierung von über 70% wurde erst nach 48 Stunden erreicht. Bei konstanter Expression von Aktin wurde zunächst auch eine geringe Abnahme der Expression des BiPro-markierten Profilins beobachtet, dessen Spiegel aber danach sogar um das 3,6-fache im Vergleich zum Ausgangswert zunahm (Abb. 20B).

Die Abbildung 21B zeigt die Gesamtprofilinmenge des PFNI/LD-Klons. Dieser hatte für die Dauer des Versuches sogar einen niedrigeren Gesamtprofilinhalt als die CAL51-Zellen. Ein Gesamtprofilinhalt vergleichbar mit den Kontroll-Zellen wurde erst 144 Stunden nach der RNAi-Behandlung und nur durch eine sehr starke Zunahme des rekombinanten Profilinspiegels erreicht. Trotz der geringen Gesamtprofilin-Expression nach der Transfektion mit siRNA-Duplices konnten die Zellen überleben und proliferieren.



**Abb. 21: Quantifizierung des Gesamtprofilingehaltes der Zellklone nach RNAi-Behandlung.**

In den Diagrammen ist die Quantifizierung des Gesamtprofilingehaltes nach RNAi-Behandlung der Zellklone dargestellt. In A sind die Werte für den PFNI/WT-Klon und in B für den PFNI/LD-Klon gezeigt. Die Werte ergeben sich aus der Summe der ermittelten Menge des endogenen und des rekombinanten Profilins. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Die Grafiken zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Eine mögliche Ursache für die Zunahme des Gehaltes an rekombinantem Profilin könnte in einer höheren Transkriptionsrate der rekombinanten PFNI-cDNA liegen. Zur Quantifizierung der mRNA-Spiegel des endogenen und des rekombinanten Profilins wurde die „Real Time“-PCR (RT-PCR) verwendet. Damit wurde untersucht, wie sich die mRNA-Menge des exogenen und des endogenen Profilins, aber auch die des Aktins im Laufe der Zeit änderte.

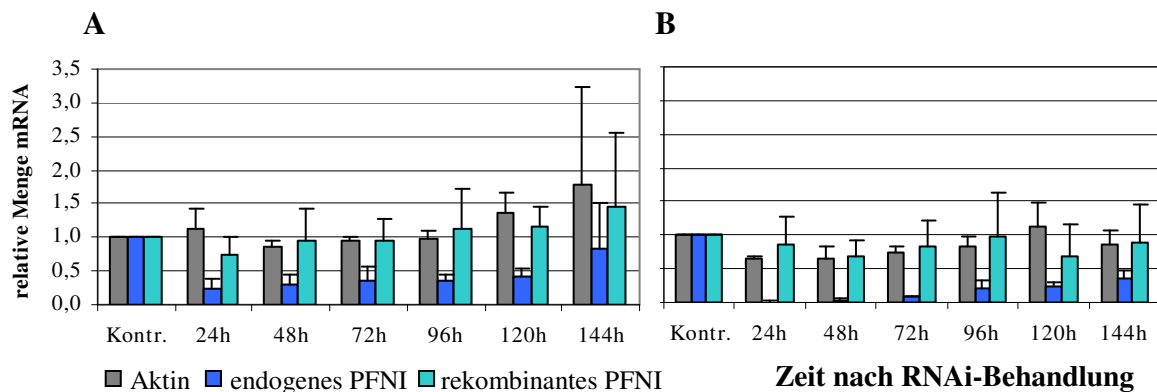
Parallel zur Herstellung von Zellextrakten zur Analyse des Proteingehaltes wurde Gesamt-RNA aus Zellen extrahiert und für die RT-PCR benutzt. (Diese Analyse wurde in Zusammenarbeit mit Marén Siemon durchgeführt.)

Die RT-PCR basiert auf dem gleichen Prinzip wie die konventionelle Polymerase-Kettenreaktion, allerdings wird bei dieser Methode die Amplifikation in Echtzeit verfolgt.

Für die „Real Time“-PCR wurde der *QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit* der Firma Qiagen verwendet. In dem Master-Mix sind eine Reverse Transcriptase und eine DNA-Polymerase enthalten, so dass sowohl die reverse Transkription als auch die PCR in einem Gefäß stattfinden. Der Versuch wurde dreimal wiederholt und pro Probe wurden jeweils drei unabhängige Reaktionsansätze gleichzeitig analysiert. Die Auswertung der RT-PCR erfolgte durch die relative Bestimmung nach Pfaffl (2001).

Die mRNA-Menge des endogenen Profilins war in beiden Klonen deutlich niedriger als die des Ausgangswertes (Abb. 22A und 22B), wobei die Reduktion bei dem PFNI/LD-Klon

höher ausfiel. Die Senkung betrug in den ersten drei Tagen nach der RNAi-Behandlung durchschnittlich 98%, im weiteren Verlauf stieg die mRNA-Menge auf 32%. Bei dem Klon, der das WT-Profilin exprimiert, war die mRNA-Menge in den ersten fünf Tagen nach der Transfektion um 66% reduziert. Die statistische Auswertung der Daten zeigte, dass die mRNA-Mengen von Aktin und rekombinanten Profilin im untersuchten Zeitraum unverändert blieben (t-test,  $p > 0,1$ ).



**Abb. 22: Auswertung der „Real Time“-PCR nach Transfektion der Zellen mit siRNA-Duplicates.**

Das Diagramm zeigt die relative mRNA-Menge sowohl des endogenen als auch des rekombinanten Profilins und von Aktin nach RNAi-Behandlung. In A ist die Quantifizierung des Klones PFNI/WT, in B die des PFNI/LD-Klones gezeigt. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Die Auswertung wurde nach Pfaffl et al. (2001) vorgenommen. Die Grafiken zeigen den Mittelwert von drei unabhängigen Versuchen, die Fehlerbalken stellen die Standardabweichung dar.

Zusammenfassend führte die Reduzierung des endogenen PFNI in Klonen, die Profilin-AD exprimieren, zur Apoptose. Hingegen konnten Zellen, die das exogene WT-Profilin und die Bindungsmutante PFNI/LD exprimierten, ohne dass gleichzeitig das genuine Profilin vorhanden war, weiter proliferieren. Ferner nahm der Gehalt des rekombinanten Proteins nach Unterdrückung des endogenen Profilins zu. Dabei war die Transkriptionsrate der mRNA des rekombinanten Proteins nicht beeinflusst. Möglicherweise findet die Erhöhung der Expression des exogenen Proteins entweder durch eine höhere Translationsrate oder durch einen geringeren Abbau statt.

## **4 Untersuchung des Einflusses der Interaktion von PFNI mit Phospholipiden**

Um den Einfluss der Ligandenbindung zu charakterisieren, wurden die Eigenschaften der Zellen, die ausschließlich PFNI/LD exprimieren, vor und nach der RNAi-Behandlung analysiert. Als Kontrolle wurden Zellen, die WT-Profilin exprimieren, verwendet.

Das Lipid PIP<sub>2</sub> spielt eine große Rolle in verschiedenen Prozessen, an denen das Mikrofilamentsystem beteiligt ist. Profilin ist aufgrund seiner Wechselwirkung mit PIP<sub>2</sub> mit dem Phosphoinositid-Signalweg verknüpft. Aus diesem Grund wurden die Organisation des Mikrofilamentsystems, das Adhäsions- und Ausbreitungsverhalten, das substratabhängige Wachstum, die Zellmigration und die Fähigkeit, auf Matrigel™ zu differenzieren, untersucht.

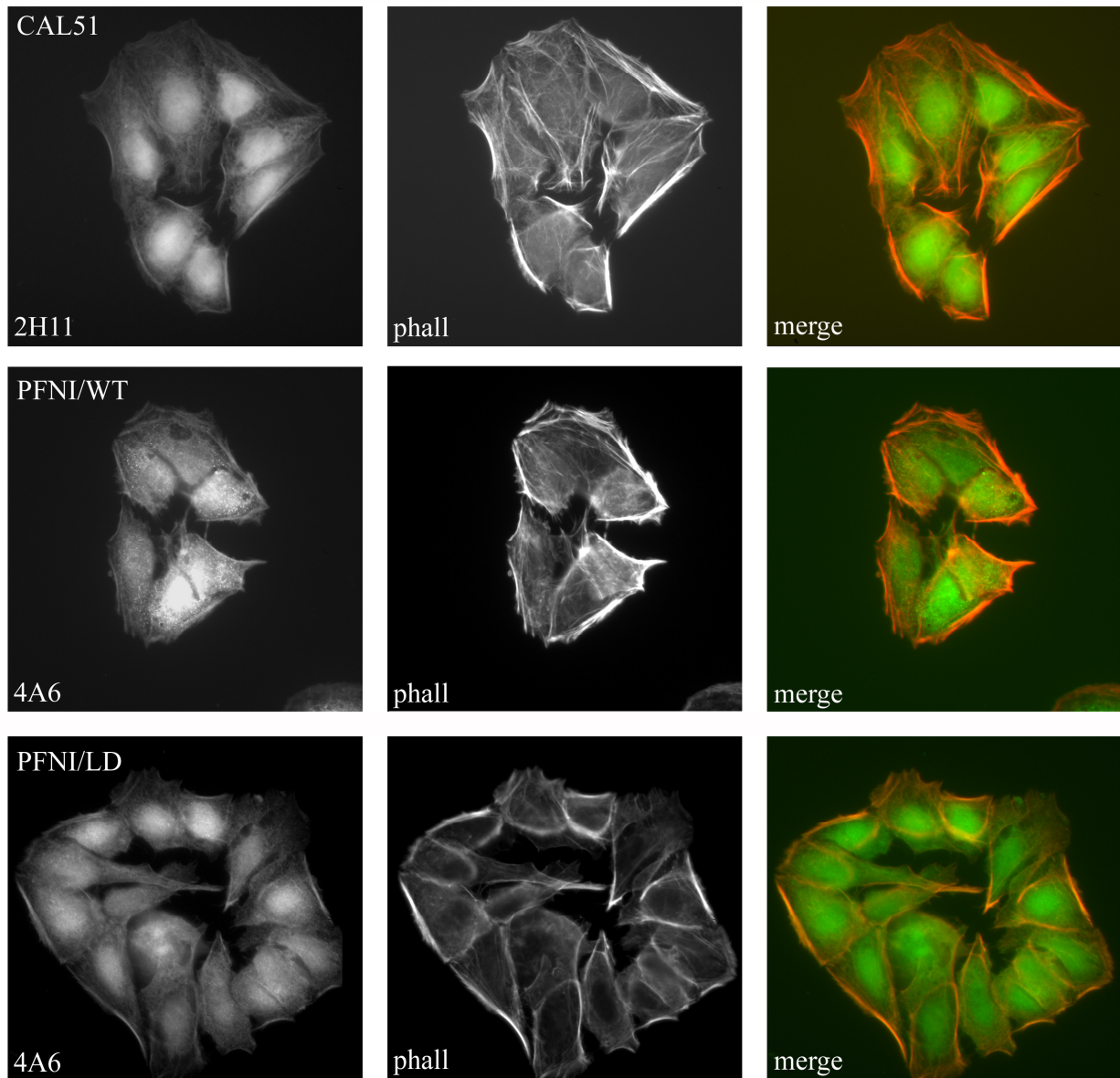
### **4.1 Vergleichende Analyse der Organisation des Mikrofilamentsystems**

Zur Charakterisierung der Organisation des Mikrofilamentsystems wurde zunächst das Aktin-Cytoskelett in CAL51-Zellen und in den untersuchten Zellklonen dargestellt und verglichen. Dabei wurden auch die Verteilung von Profilin in den CAL51-Zellen und die der rekombinanten Profile in den generierten Klonen untersucht.

Die Zellen wurden ausgesät, fixiert, permeabilisiert und das Aktin-Cytoskelett mit TRITC-gekoppeltem Phalloidin dekoriert. Die stabil exprimierten Profile wurden mit dem anti-BiPro-Antikörper 4A6 und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper identifiziert. Für den Nachweis des endogenen Profilin I in CAL51-Zellen wurde der monoklonale anti-Profilin-Antikörper 2H11 verwendet. Das rekombinante Wildtyp-Profilin zeigte die gleiche Verteilung wie das endogene Profilin. Ebenso beeinflusste die Mutation der Bindungsstelle für PIP<sub>2</sub> nicht die cytoplasmatische Lokalisation des Profilins, jedoch konnte hier eine Akkumulation im Kern beobachtet werden (Abb. 23).

Die Darstellung des Aktin-Cytoskeletts der CAL51-Zellen und der anderen untersuchten Zellklone zeigte, dass sich keine auffälligen Unterschiede beim Vergleich der Organisation der Aktinfilamente der stabilen Transformanten und der Ausgangszelllinie ergaben. Das Cytoskelett war gut ausgebildet, Adhäsionsgürtel und Stressfasern waren vorhanden (Abb. 23). Es gab sowohl Zellen, die stark ausgeprägte Adhäsionsgürtel und Stressfasern besaßen, als auch Zellen, die wenige F-Aktin-Strukturen aufwiesen. Dies konnte bei allen Zellklonen, die die Profilinmutanten exprimierten, beobachtet werden. Allerdings zeigten die

Zellen des PFNI/LD-Klons immer schwächer ausgebildete Stressfasern verglichen mit den WT-Profilin I-exprimierenden Zellen. Die Expression des rekombinanten Profilins in der Krebszelllinie CAL51 beeinflusste somit nur minimal die Morphologie und die Organisation des Cytoskeletts.



**Abb. 23: Darstellung des Aktin-Cytoskeletts in den stabilen CAL51-Klonen.**

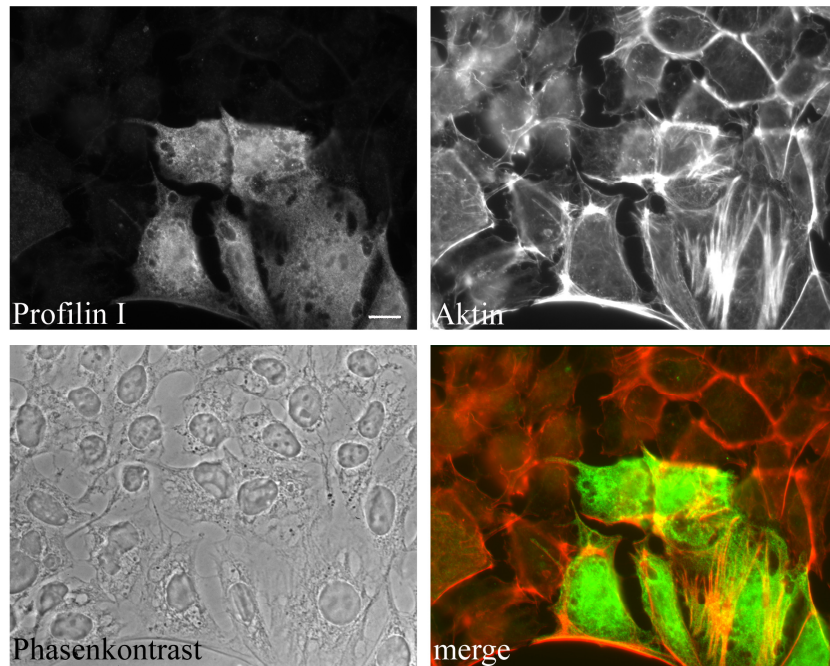
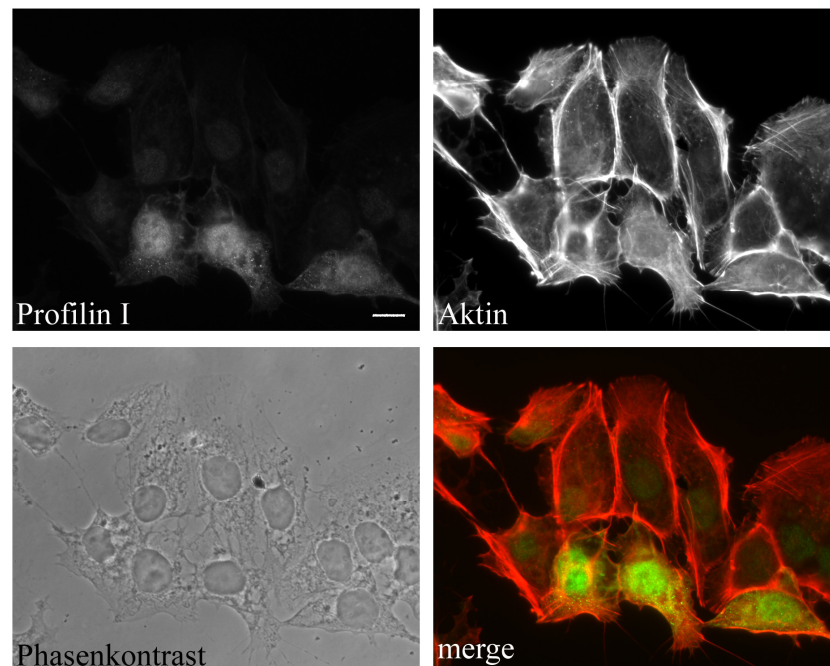
CAL51-Zellen, PFNI/WT-exprimierende Zellen und PFNI/LD-exprimierende Zellen sind gezeigt. Das endogene Profilin wurde mit dem Antikörper 2H11 nachgewiesen, die BiPro-markierten Profileine wurden mit dem Antikörper 4A6 identifiziert. Rhodamin-konjugiertes anti-Maus-IgG wurde als sekundärer Antikörper verwendet. Das Aktin-Cytoskelett wurde durch Dekoration mit Phalloidin-TRITC dargestellt. Der Balken entspricht 10 µm.

Zur Analyse des Einflusses der PIP<sub>2</sub>-Bindung auf die Organisation des Mikrofilamentsystems nach RNAi-Behandlung wurden die Zellen auf Deckgläschen ausgesät und mit siRNA-Duplicates transfiziert. Für die Dauer von sechs Tagen wurden die Zellen jeweils alle 24 Stunden fixiert, permeabilisiert und angefärbt. Die Färbung des Aktin-Cytoskeletts erfolgte mit TRITC-gekoppelten Phalloidin, während die Färbung des endogenen Profilins mit dem Antikörper 2H11 und dem sekundären Antikörper anti-Maus IgG-Alexa-Fluor 488 erfolgte.

Abbildung 24 stellt exemplarisch die Zellen 72 Stunden nach der RNAi-Behandlung dar. Die Phasenkontrast-Aufnahmen zeigten keine signifikante Veränderung in der Morphologie der Zellen sowohl des PFNI/WT- als auch des PFNI/LD-Klons. Die Darstellung des Aktin-Cytoskeletts des PFNI/WT-Klons bis zum Zeitpunkt  $t = 96$  Stunden zeigte, dass ca. 80% der Zellen, in denen die Expression des endogenen Profilins ausgeschaltet war, keine ausgeprägten Adhäsionsgürtel im Vergleich zu den Kontroll-Zellen aufwiesen. Zu späteren Zeitpunkten waren solche Unterschiede nicht mehr vorhanden.

Der PFNI/LD-Klon ergab ein ganz anderes Bild. Die meisten Zellen (75%), die das endogene Profilin nicht mehr enthielten, zeigten bis zum Zeitpunkt  $t = 120$  Stunden verstärkte Adhäsionsgürtel und deutlich weniger Stressfasern. Die veränderte Organisation des Aktin-Cytoskeletts konnte jedoch in Präparaten, die zum Zeitpunkt  $t = 144$  Stunden angefärbt wurden, nicht mehr beobachtet werden. Diese entsprach jetzt der von nicht transfizierten Zellen. Zu diesem Zeitpunkt konnte sowohl anhand des Immunblots (Abb. 19) als auch mit Hilfe der RT-PCR (Abb. 22) gezeigt werden, dass der endogene Profilin Gehalt wieder anstieg.



**A****B**

**Abb. 24: Darstellung des Aktin-Cytoskeletts in den stabilen CAL51-Klonen nach RNAi.**

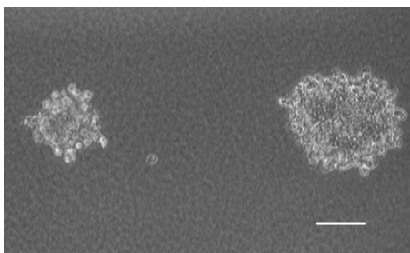
Die Immunfluoreszenzen zeigen die CAL51-Zellderivate, die Wildtyp-Profilin I (A) und die Mutante PFNI/LD (B) exprimierten, 72 Stunden nach der RNAi-Behandlung. Das endogene Profilin wurde mit dem Profilin-Antikörper 2H11 identifiziert, während das Aktin-Cytoskelett durch Dekoration mit Phalloidin-TRITC dargestellt wurde. Der Balken entspricht 10  $\mu\text{m}$ .



Die Expression des rekombinanten Proteins ohne endogenen Hintergrund führte in den zwei untersuchten Zellklonen zu unterschiedlichen Ergebnissen. Der PFNI/WT-Klon zeigte bei reduziertem Gesamtprofilingehalt keine stark ausgebildeten Adhäsionsgürtel mehr, während die Zellen der PFNI/LD-Klon diffuse Stressfasern, aber verstärkte Adhäsionsgürtel im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen, aufwiesen (siehe Tabelle 11).

## 4.2 Analyse des Einflusses der PIP<sub>2</sub>-Bindung auf die Koloniebildung in Softagar

Die Bedeutung der PIP<sub>2</sub>-Bindung für die Organisation des Mikrofilamentsystems wurde durch die Analyse des substratabhängigen Wachstums untersucht. Normale, adhärent wachsende Zellen können in Weichagar nicht proliferieren, weil diese Kultivierung die Adhäsion von Zellen verhindert. Im Gegensatz dazu sind Krebszellen in der Lage, verankerungsunabhängig zu wachsen und können so in Weichagar dreidimensionale Zellaggregate bilden (Abb. 25).



**Abb. 25: Koloniebildung in Weichagar.**

In der Abbildung ist die Morphologie von CAL51-Zellen gebildeten Kolonien in Weichagar nach 3 Wochen gezeigt. Die Zellen liegen überwiegend als dreidimensionale Zellaggregate vor, die nur von tumorigenen Zellen gebildet werden können.

Balken: 100  $\mu\text{m}$ .

Mit diesem Versuch kann man demzufolge ermitteln, in wie weit der Verlust der Interaktion zwischen Profilin und PIP<sub>2</sub> die Eigenschaften der CAL51-Zellen beeinflusst.

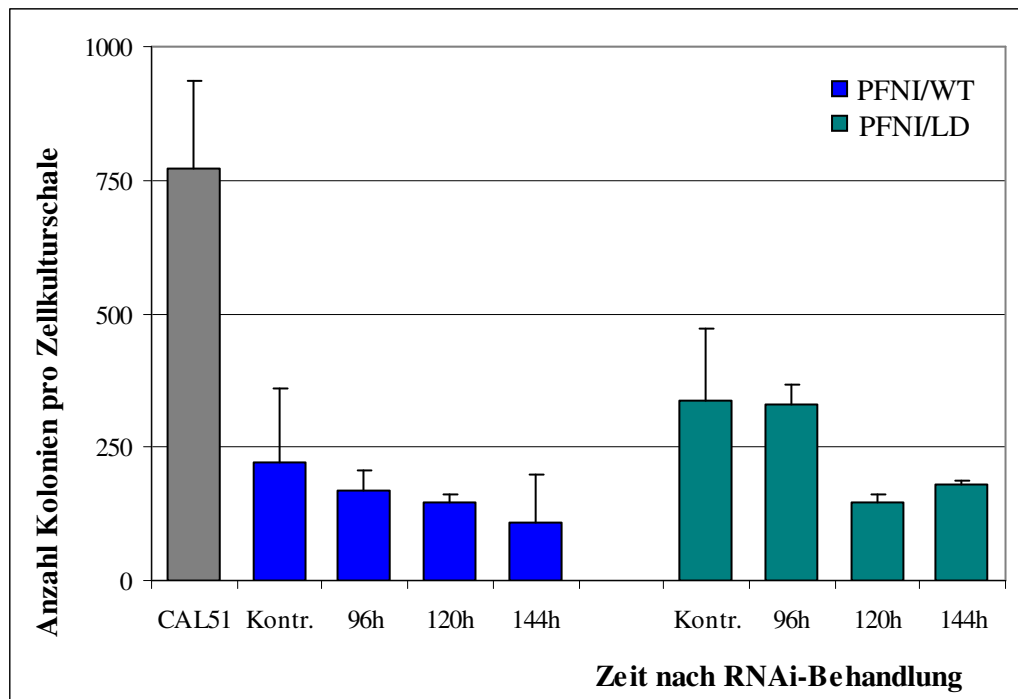
Die Durchführung von solchen Langzeitstudien war möglich, weil die Expression des endogenen Profilins bis zum Zeitpunkt  $t = 120$  Stunden stabil niedrig blieb (Abb. 19).

Die Zellen wurden zunächst mit RNAi behandelt, danach wurden alle 24 Stunden pro Zellkulturschale  $2,5 \times 10^4$  vereinzelte Zellen in Agar-haltigem Medium ausgesät. Die Kulturen wurden drei Wochen im CO<sub>2</sub>-Inkubator inkubiert, anschließend wurde die Anzahl der entstandenen Kolonien bestimmt (Abb. 26).

Unmittelbar nach der Transfektion, bis zu den Zeitpunkten  $t = 48$  Stunden für den PFN/WT-Klon und  $t = 72$  Stunden für den PFNI/LD-Klon, teilten sich die Zellen deutlich langsamer als die der Kontrolle. Nach der RNAi-Behandlung war die Fähigkeit der Klone, Kolonien zu bilden, reduziert. Dies war nicht nur bei Zellen, die mit siRNA-Duplices transfiziert wurden,

zu beobachten, sondern auch bei den Kontroll-Zellen, die nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert wurden (Daten nicht gezeigt), das cytotoxisch auf die Zellen wirken kann (Spagnou et al., 2004). Dies könnte dazu führen, dass die im Weichagar neu ausgesäten Zellen zunächst nicht in der Lage waren, sich zu vermehren. Mit der Seefeldmethode wurde das Wachstumsverhalten der Klone bestimmt. Eine Proliferationsrate, die der der unbehandelten Zellen entsprach, wurde bei den mit dem Transfektionsreagenz inkubierten Zellen des PFNI/WT-Klons zum Zeitpunkt  $t = 72$  Stunden erreicht, während die Zellen des PFNI/LD-Klons zum Zeitpunkt  $t = 96$  Stunden die gleiche Generationszeit wie die Kontroll-Zellen aufwiesen (Daten nicht gezeigt).

Daher sind sowohl in diesem als auch in den folgenden Versuchen in den Grafiken nur die Daten gezeigt, die für die Klone 96 Stunden nach RNAi-Behandlung erhoben wurden.



**Abb. 26: Verankerungsunabhängiges Wachstum der CAL51-Zellklone in Weichagar.**

Die stabilen Zellklone wurden transient mit siRNA transfiziert und über die Dauer von 6 Tagen jeweils zu den angegebenen Zeiten nach der RNAi-Behandlung in Weichagar ausgesät. Es wurden  $2,5 \times 10^4$  Zellen in 0,3% Weichagar in Medium ausgesät, drei Wochen bei  $37^\circ\text{C}$ , 10%  $\text{CO}_2$  und 90% Luftfeuchtigkeit inkubiert und die gebildeten Zellkolonien pro Zellkulturschale ausgezählt. Als Kontrolle dienten die nicht transfizierten Zellklone. Dargestellt ist die Standardabweichung von jeweils zwei unabhängigen Versuchen.

Die unbehandelten Tumorzellen CAL51 zeigten mit durchschnittlich 750 Kolonien pro Zellkulturschale ein starkes Wachstum. Die Expression von Wildtyp-Profilin und von Profilin-LD führte mit durchschnittlich 220 bzw. 336 Kolonien pro Zellkulturschale zu einer signifikanten Abnahme der Koloniebildung. Dieses Resultat bestätigt frühere Daten, wonach

eine moderate Überexpression von Profilin in Brustkrebszellen zur Suppression der Tumoreigenschaften führt (Janke et al., 2000; Wittenmayer et al., 2004).

Im Laufe des Versuches bildeten die mit pfn-si-1 transfizierten Zellen des WT-Klons eine konstante Anzahl von Kolonien. Lediglich die Zellen, die am Zeitpunkt  $t = 144$  Stunden nach der Transfektion ausgesät wurden, wiesen eine signifikant reduzierte Fähigkeit, Kolonien zu bilden, auf. Die Anzahl der Kolonien verringerte sich um 49% im Vergleich zur Kontrolle (t-test,  $p < 0,5$ ).

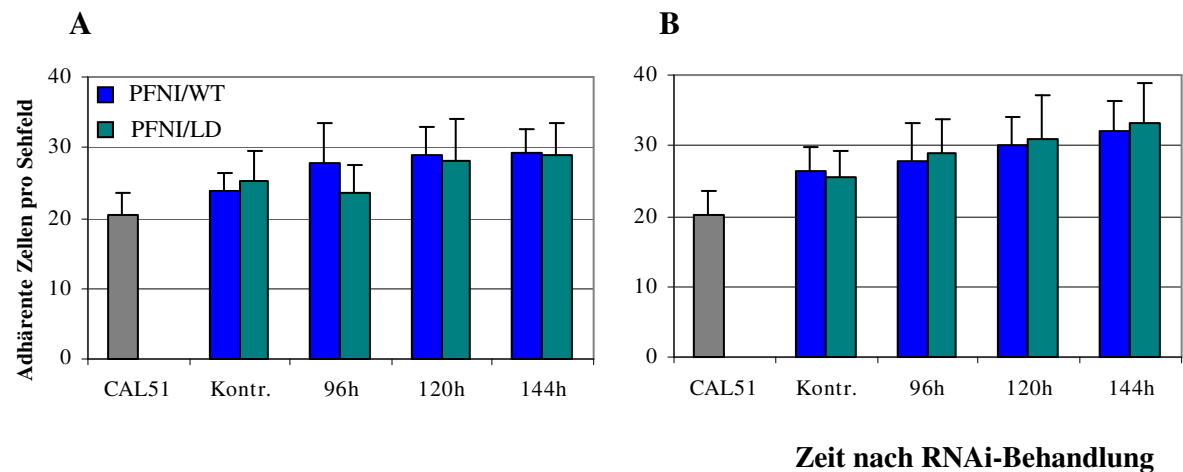
Eine Reduzierung der Fähigkeit, dreidimensionale Aggregate zu bilden, wurde auch bei dem PFNI/LD-Klon nach RNAi-Behandlung nachgewiesen. Eine signifikante reduzierte Koloniebildung (57% weniger Kolonien im Vergleich zur Kontrolle) konnte schon zum Zeitpunkt  $t = 120$  Stunden beobachtet werden (s. Tabelle 11).

Dieses Resultat deutet darauf hin, dass die Expression von PFNI/LD die Fähigkeit des Klons beeinflusst, Kolonien zu bilden. Der Klon, der einen hohen Gehalt des rekombinanten PFNI/LD aufweist, zeigt eine Hemmung des substratabhängigen Wachstums, verglichen mit den unbehandelten Zellen und den Zellen des PFNI/WT-Klons.

### **4.3 Analyse der Absetz- und Ausbreitungsrate**

Durch die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix werden intrazelluläre Prozesse in Gang gesetzt, die zur Umstrukturierung des Cytoskeletts und zur Induktion von Signalkaskaden führen können. Die Fähigkeit der Zellen, die Profilin-LD exprimieren, Zell-Matrix-Kontakte zu bilden, wurde mit Hilfe der Zelladhäsions-Analyse charakterisiert.

Die Zellen wurden mit RNAi behandelt und danach über einen Zeitraum von sechs Tagen im 24 Stunden-Rhythmus für den Versuch verwendet.  $5 \times 10^4$  Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 30 und 60 Minuten fixiert. Die Deckgläschen wurden zuvor mit vier verschiedenen Matrices, Fironektin, Laminin, Collagen und Poly-L-Lysin, beschichtet oder es wurden unbeschichtete Deckgläschen verwendet. Vor der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit PBS gut gewaschen, um die nicht adhären Zellen zu entfernen. Es folgte die Permeabilisierung mit Triton X-100 und die Färbung des Aktin-Cytoskeletts und des Profilins. Anschließend wurde die Auswertung am Fluoreszenz-Mikroskop vorgenommen, wo 400 bis 600 Zellen in mindestens 20 zufälligen Gesichtsfeldern gezählt wurden. In den Diagrammen ist der Mittelwert der Anzahl der abgesetzten Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen pro Sehfeld dargestellt (Abb. 27).



**Abb. 27: Analyse des Absetzverhaltens der Zellklone nach „knock down“ des endogenen Profilin I.**

$5 \times 10^4$  Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 30 und 60 Minuten gewaschen, fixiert und permeabilisiert. Nach der Permeabilisierung folgte die Färbung des endogenen Profilin I mit dem 2H11-Antikörper und mit einem FITC-gekoppelten zweiten Antikörper. Das Aktin-Cytoskelett wurde mit Phalloidin-TRITC dekoriert. Die Abbildung zeigt die adhärennten Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen für den Wildtyp-Klon und den PFNI/LD-Klon nach 30 (A) und nach 60 (B) Minuten. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. In mindestens 20 Gesichtsfeldern wurden 400 bis 600 Zellen ausgezählt und die daraus resultierenden Mittelwerte dargestellt. Die Fehlerbalken ergeben sich aus drei unabhängigen Versuchen.

Bei den Zellen des PFNI/WT-Klons, die auf unbeschichteten Deckgläschen ausgesät wurden, wurden 30 Minuten nach Aussaat durchschnittlich 22% mehr abgesetzte Zellen im Vergleich zur Kontrolle ermittelt (t-test,  $p < 0,05$ ; Abb. 27A). Die Auswertung der abgesetzten Zellen des PFNI/WT-Klons 60 Minuten nach Aussaat zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Kontroll-Zellen und den siRNA-transfizierten Zellen (Abb. 27B).

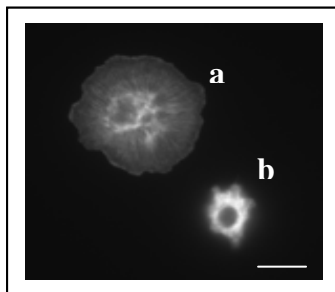
Die Zellen, die auf anderen Substraten ausgesät wurden, zeigten sowohl 30 als auch 60 Minuten nach Aussaat keinen signifikanten Unterschied im Vergleich zur Kontrolle.

Die Zellen des PFNI/LD-Klons, die 30 Minuten nach Aussaat auf unbeschichteten Deckgläschen fixiert wurden, wiesen keine Änderung im Adhäsionsverhalten auf (Abb. 27A). Hingegen konnte nach 60 Minuten eine signifikante Zunahme an abgesetzten Zellen beobachtet werden (Abb. 27B) und dies unabhängig vom Zeitpunkt der RNAi-Behandlung (s. Tabelle 10). Auch bei den Zellen, die auf Poly-L-Lysin ausgesät wurden, wurden Unterschiede im Absetzverhalten gefunden. 30 Minuten nach Aussaat konnten 30% mehr Zellen im Vergleich zur Kontrolle ausgezählt werden, wobei nach 60 Minuten kein signifikanter Unterschied mehr auftrat. Eine höhere Anzahl abgesetzter Zellen verglichen zur Kontrolle wurde bei den Zellen festgestellt, die auf Laminin ausgesät wurden. Sowohl 30 als auch 60 Minuten nach Aussaat stieg die Absetztrate um durchschnittlich 54%. Bei den Zellen,

die auf Collagen oder Fibronectin ausgesät wurden, blieb die Zahl abgesetzter Zellen, verglichen mit der Kontrolle, für die Dauer des Versuches konstant (s. Tabelle 10).

Ein weiterer Versuch, mit dem die Fähigkeit von Zellen, Zell-Matrix-Kontakte zu bilden, untersucht werden kann, ist der „spreading assay“. Viele Tumorzellen können sich nicht so schnell an das Substrat anheften und zeigen im Vergleich zu normalen Zellen eine verlangsamte Ausbreitung.

Die Ausbreitungsrate ist das Verhältnis ausgebreiteter zu nicht ausgebreiteten Zellen. In Abbildung 28 ist ein Beispiel von ausgebreiteten (a) und nicht ausgebreiteten (b) Zellen gezeigt.



**Abb. 28: „Spreading“ der CAL51-Zellklone nach RNAi-Behandlung.**

Die Abbildung zeigt große, flache, ausgebreitete Zellen (a), die sich von kleinen, runden, nicht ausgebreiteten Zellen (b) unterscheiden. Der Balken entspricht 10 µm.

Unbehandelte Zellen des PFNI/WT- und des PFNI/LD-Klons zeigten auf allen untersuchten Matrices 30 Minuten nach Aussaat eine höhere Ausbreitungsrate als CAL51-Zellen. Nach RNAi-Behandlung zeigten die Zellen des PFNI/WT-Klons im Vergleich zu den nicht behandelten Zellen des Klons keine Veränderung des Verhältnisses ausgebreiteter zu nicht ausgebreiteten Zellen. Dies wurde auf allen getesteten Matrices sowohl 30 (Abb. 29A) als auch 60 Minuten nach Aussaat beobachtet (Abb. 29B). Hingegen wurde eine signifikante Erhöhung um durchschnittlich 12% des Anteils ausgebreiteter Zellen beim PFNI/LD-Klon 30 Minuten nach Aussaat auf Fibronectin und auf unbeschichteten Deckgläschen beobachtet. Jedoch zeigten die Zellen, die 60 Minuten nach Aussaat fixiert wurden, eine identische Rate an ausgebreiteten Zellen wie die Kontroll-Zellen (s. Tabelle 10).

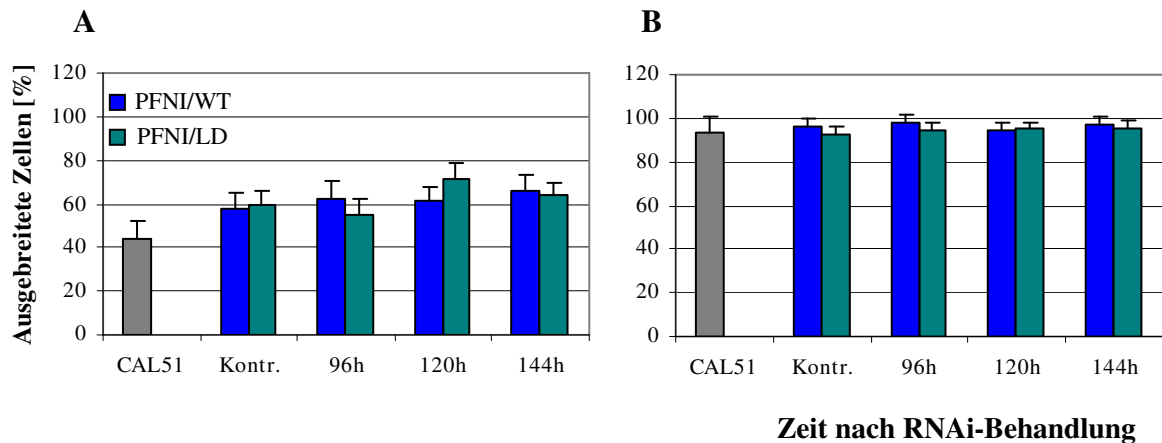
**Tab. 10:** Absetz-, Ausbreitungsverhalten und Migrationsrate auf verschiedene Matrices

	<b>PFNI/WT-Klon nach RNAi</b>		<b>PFNI/LD-Klon nach RNAi</b>	
<b>Adhäsion</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<b>Unbeschichtet</b>	↑ 22% vgl. zur Kontrolle	∅	∅	↑ 20% vgl. zur Kontrolle
<b>Fibronectin</b>	∅	∅	∅	∅
<b>Laminin</b>	∅	∅	↑ 54% vgl. zur Kontrolle	↑ 54% vgl. zur Kontrolle
<b>Collagen</b>	∅	∅	∅	∅
<b>Poly-L-Lysin</b>	∅	∅	↑ 30% vgl. zur Kontrolle	∅
<b>Spreading</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>	<b>30 min</b>	<b>60 min</b>
<b>Unbeschichtet</b>	∅	∅	↑ 12% vgl. zur Kontrolle	∅
<b>Fibronectin</b>	∅	∅	↑ 12% vgl. zur Kontrolle	∅
<b>Laminin</b>	∅	∅	∅	∅
<b>Collagen</b>	∅	∅	∅	∅
<b>Poly-L-Lysin</b>	∅	∅	∅	∅
<b>Migration</b>	<b>nach 24 Stunden</b>		<b>nach 24 Stunden</b>	
<b>Unbeschichtet</b>	∅		↑ 51% vgl. zur Kontrolle und um 32% vgl. zu PFNI/WT-Zellen	
<b>Fibronectin</b>	∅		↑ 112% vgl. zur Kontrolle	
<b>Laminin</b>	∅		Kein Unterschied zur Kontrolle und ↑ 50% vgl. zu PFNI/WT-Zellen	
<b>Collagen</b>	∅		Kein Unterschied zur Kontrolle und ↑ 53% vgl. zu PFNI/WT-Zellen	
<b>Poly-L-Lysin</b>	↑ 103% vgl. zur Kontrolle		↑ 71% vgl. zur Kontrolle und ↑ 91% vgl. zu PFNI/WT-Zellen	

∅: Kein Unterschied zur Kontrolle

↑: Steigerung um

t-test, signifikante Unterschied für  $p < 0,05$



**Abb. 29: „Spreading“ der CAL51-Zellklone nach RNAi-Behandlung.**

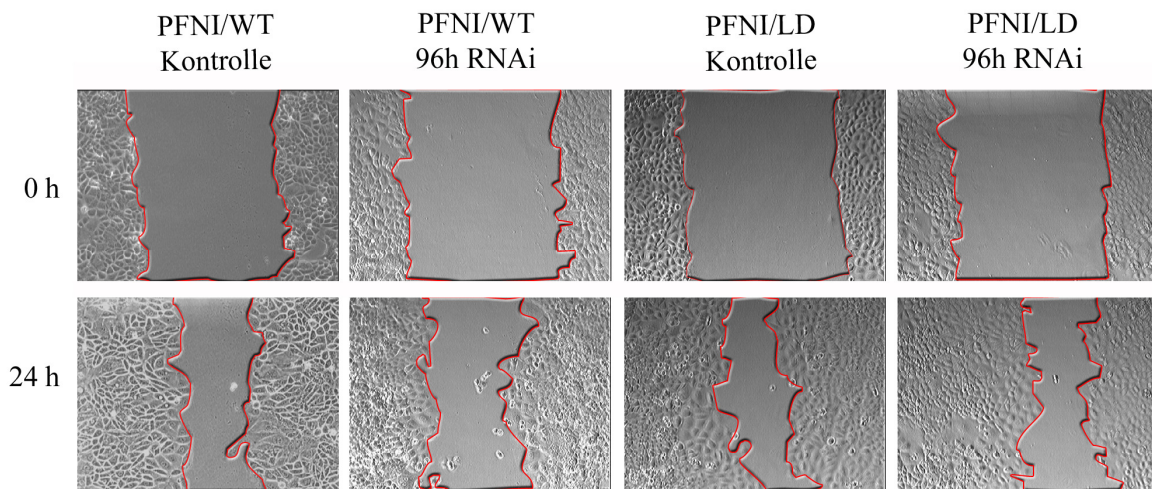
$5 \times 10^4$  Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und nach 30 und 60 Minuten fixiert. Nach der Permeabilisierung folgte die Färbung des endogenen Profilin I mit dem 2H11-Antikörper und einem FITC-gekoppelten zweiten Antikörper. Das Aktin-Cytoskelett wurde mit Phalloidin-TRITC dargestellt. Für die Auswertung wurden die Zellen in zwei Kategorien eingeteilt: Große, flache, ausgebreitete Zellen und kleine, runde, nicht ausgebreitete Zellen. Die Abbildung zeigt den Anteil an ausgebreiteten Zellen auf unbeschichteten Deckgläschen für den Wildtyp-Klon und den PFNI/LD-Klon nach 30 (A) und nach 60 (B) Minuten. Als Kontrolle wurden die Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Die Fehlerbalken ergeben sich aus drei unabhängigen Versuchen.

Zusammenfassend zeigten die Zellen, die ausschließlich PFNI-LD exprimieren, allgemein eine erhöhte Absetzrate verglichen zu den Zellen, die noch das endogene Profilin exprimierten. Diese Steigerung war, je nach verwendeter Matrix, unterschiedlich ausgeprägt, wobei auf Fibronektin und Collagen kein Unterschied beobachtet wurde. Dieses Ergebnis ist ein Hinweis darauf, dass eine reduzierte Bindung von Profilin I an  $\text{PIP}_2$  das Absetzverhalten der Zellen beeinflusst. Ebenfalls beeinflusst PFNI/LD das Ausbreitungsverhalten der Zellen. Zellen, die eine höhere Konzentration an PFNI/LD aufweisen (Abb. 19) können sich im Vergleich zu den Kontroll-Zellen schneller auf Fibronektin und unbeschichteter Oberfläche ausbreiten.

#### 4.4 Analyse der Zellmigration

Ein koordinierter Auf- und Abbau des Mikrofilamentssystems ist notwendig für eine gerichtete Bewegung. Die Motilität von Zellen beruht auf dem räumlich und zeitlich kontrollierten Zusammenspiel von Adhäsion und Aktinpolymerisation (Sechi und Wehland, 2000). Als Regulator der Aktindynamik nimmt Profilin I an der Migration von Zellen Anteil. Um das Migrationsverhalten von Zellen zu analysieren, wurde ein „wounding assay“ verwendet.

Dafür wurden  $5 \times 10^5$  Zellen in die Vertiefung einer 24-Loch-Platte ausgesät. Die Platten wurden davor mit verschiedenen Matrices, wie in Material und Methoden beschrieben, beschichtet. 24 Stunden nach Aussaat wurden die Zellen mit siRNA-Duplices transfiziert. 96 Stunden nach der Transfektion wurde in den konfluent gewachsenen Zellrasen eine Wunde gezogen. Um eine zellteilungsbedingte Schließung der Wunde zu verhindern, wurde zu den Zellen, gleich nachdem die Wunde gezogen wurde, der Mitose-Inhibitor Cytosin- $\beta$ -Arabinofuranosid zugegeben. Nach 24 Stunden wurden die Wunden fotografiert (Abb. 30) und der Grad des Wundverschlusses mit der Software MetaMorph<sup>®</sup> ausgewertet.

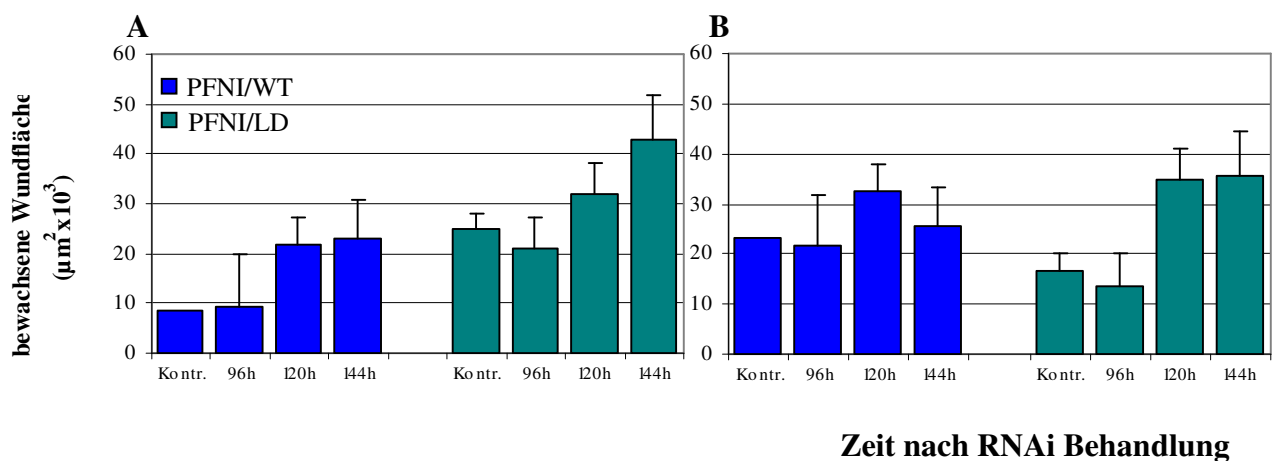


**Abb. 30: Untersuchung des Zellmigrationsverhaltens.**

In einen konfluenten Zellrasen wurde eine kleine Wunde (0 h) gezogen. Nach 24 Stunden wurde dokumentiert, wie schnell die Zellen in die Wunde einwandern können. In der Abbildung sind exemplarisch für jeden Klon die Wunden nach 0 und 24 Stunden im Phasenkontrast gezeigt. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Der Balken entspricht 100  $\mu\text{m}$ .



Die Migrationsrate der RNAi-behandelten Zellen des Wildtyp-Klons änderte sich in den verschiedenen getesteten Matrices im Vergleich zu der der Kontroll-Zellen nicht. Eine Zunahme der Lokomotion um 103% (t-test,  $p < 0,05$ ) wurde nur bei den Zellen, die auf Poly-L-Lysin ausgesät wurden, beobachtet (Abb. 31A). Hingegen konnte eine signifikante Erhöhung des Wanderungsgrades der Zellen des PFNI/LD-Klons beobachtet werden. Diese Zellen zeigten eine höhere Migrationsrate als die Zellen des WT-Klons und diese betrug durchschnittlich 56%. Nur auf Fibronectin war die Migrationsrate der Zellen des PFNI/WT-Klons und des PFNI/LD-Klons gleich. Außerdem konnte zum Zeitpunkt  $t = 144$  Stunden (t-test,  $p < 0,05$ ) auf allen untersuchten Matrices ein höherer Wanderungsgrad als der der Kontroll-Zellen nachgewiesen werden. Besonders motil waren die Zellen, die auf Fibronectin und auf Poly-L-Lysin ausgesät wurden. Diese zeigten eine bewachsene Wundfläche, die durchschnittlich das 1,9-fache im Vergleich zu den Kontroll-Zellen betrug (Abb. 31 und Tabelle 10).



**Abb. 31: Auswertung des „wounding assay“.**

Im Diagramm ist die Auswertung des „wounding assay“ dargestellt. Die Differenz, die aus den Wundflächen nach 0 und 24 Stunden ermittelt wurde ( $\mu\text{m}^2$ ), stellt den in die Wunde eingewachsenen Bereich dar. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Exemplarisch sind die Diagramme gezeigt, die die bewachsene Wundfläche auf Poly-L-Lysin (A) und auf Fibronectin (B) darstellen. Es wurden Mittelwerte in zwei unabhängigen Versuchen aus je drei Wunden ermittelt, die mit der Standardabweichung dargestellt sind.

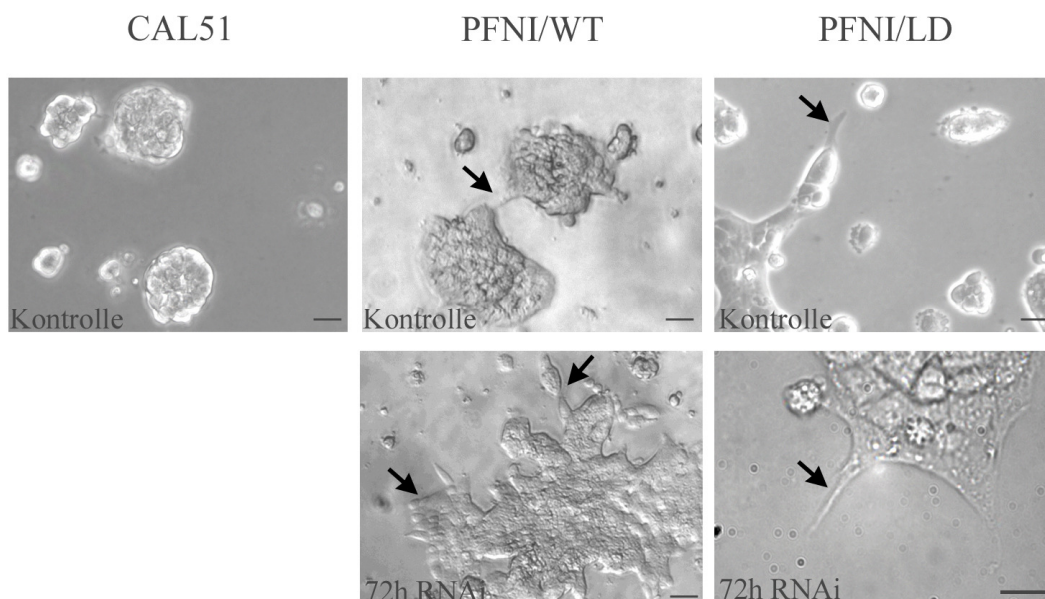
Die fehlende Bindung von Profilin an  $\text{PIP}_2$  führt somit zu einer höheren Migrationsrate. Der Wanderungsgrad der Zellen scheint vom PFNI/LD-Gehalt abhängig zu sein, da die Zellen mit dem höheren PFNI/LD-Anteil sich am schnellsten fortbewegen konnten.

#### 4.5 Differenzierung auf Matrigel™

Die wichtigste Funktion von Profilin in Zellen ist sicher die Modulation der Aktin-Polymerisation. Das Aktin-Cytoskelett ist jedoch nicht nur für die mechanische Stabilisierung der Zelle und ihrer äußeren Form verantwortlich, sondern seine Funktion umfasst Prozesse wie die Zelladhäsion, die Proliferation von Zellen und die Zellmigration, aber auch die Zelldifferenzierung. Um den Zusammenhang zwischen dem Differenzierungsgrad und der Interaktion zwischen Profilin und PIP<sub>2</sub> zu untersuchen, wurden Zellen auf Matrigel™, einer der extrazellulären Matrix ähnlichen Substanz, kultiviert (Kleinman et al., 1982).

Hier wurden die Zellen nicht in das Matrigel™ eingebettet, sondern es wurde ein modifiziertes Protokoll verwendet, wonach die Zellen auf einer Matrigel™-Schicht ausgesät wurden (White et al., 1990). Der Vorteil dieses Protokolls ist, dass es die Möglichkeit einer frühzeitigen Auswertung bietet.

Die mit siRNA-Duplices transfizierten Zellen wurden in Abständen von 24 Stunden auf die Matrigel™-Schicht ausgesät und für 72 Stunden inkubiert. Anschließend erfolgte die Auswertung am Mikroskop.



**Abb. 32: Differenzierung der Zellmutanten auf Matrigel™.**

$5 \times 10^4$  Zellen in 0,5 ml Medium wurden auf eine Matrigel™-Schicht ausgesät und dann bei 37°C, 90% Luftfeuchtigkeit und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Das Wachstum und die Differenzierung der Zellklone auf diesem Substrat wurden anschließend nach 72 Stunden fotografisch dokumentiert. Als Kontrolle wurden Zellen nur mit dem Transfektionsreagenz inkubiert. Die Balken entsprechen 50 μm.

Die morphologischen Unterschiede zwischen den CAL51-Zellen und den verwendeten Zellklonen sind in Abbildung 32 zu erkennen. Die CAL51-Zellen teilten sich und bildeten nur Zellaggregate, die als runde Kolonie vorlagen. Die Zellen des WT-Klons wuchsen, 72 Stunden nachdem sie ausgesät wurden, in ausgebreiteten Kolonien, die Ausläufer und Verbindungen zueinander bilden konnten. Die Transfektion mit siRNA-Duplices änderte nicht die Fähigkeit dieser Zellen, in einem epithelartigen Rasen zu wachsen, wobei einzelne Zellen in der Lage waren, lange Ausläufer zu bilden (Abb. 32).

Die Zellen des PFNI/LD-Klons konnten, wie schon die Zellen des PFNI/WT-Klons, röhrenähnliche Ausläufer in alle Richtungen und teilweise auch als Verbindung zu anderen Zellen bilden. Dies geschah sowohl bei den RNAi-behandelten Zellen als auch bei den nicht behandelten Zellen (s. Tabelle 11).

**Tab. 11:** Zusammenfassung der Ergebnisse

	PFNI/WT-KLON		PFNI/LD-KLON	
	CAL51-Zellen wurden mit einer cDNA, die für Wildtyp-PFNI codiert, transfiziert		CAL51-Zellen wurden mit einer cDNA, die für PFNI mit einer reduzierten PIP <sub>2</sub> -Bindung codiert (R88E-R136D), transfiziert	
	nicht behandelte Zellen	endogenes PFNI „knock down“	nicht behandelte Zellen	endogenes PFNI „knock down“
<b>Profilin I-Gehalt</b>	Erhöhung des PFNI-Gehalt um 20% i. Vgl. zu CAL51-Zellen	Gesamtprofilingehalt nahezu stabil für die Dauer des Versuches	Erhöhung des PFNI-Spiegel um 12% i. Vgl. zu CAL51-Zellen	Abnahme des Gesamtprofilingehaltes 48 und 72 h nach RNAi-Behandlung um 70%. Zunahme des rekombinanten PFNI bis zum 3,6-fachen
<b>Generationszeiten</b>	32,3 Stunden	nd	27,2 Stunden	nd
<b>Aktin-Cytoskelett</b>	Aktin-Cytoskelett gut ausgebildet, organisierte Stressfasern vorhanden	Keine ausgeprägten Adhäsionsgürtel in ca. 80% der Zellen bis t=96 h. Danach keine Unterschiede zu den nicht transfizierten Zellen	Schwächer ausgebildete Stressfasern i. Vgl. zum PFNI/WT-Klon	In ca. 75% der Zellen bis t=120 h verstärkte Adhäsionsgürtel und weniger Stressfasern vgl. zu den nicht transfizierten Zellen. Keine Unterschiede zu späteren Zeitpunkten
<b>Substratabhängiges Wachstum</b>	220 Kolonien	Reduzierung der Koloniebildung zu t=144 h um 49% i. Vgl. zur Kontrolle	336 Kolonien	Reduzierung der Koloniebildung ab t=120 h um durchschnittlich 51% i. Vgl. zur Kontrolle
<b>Differenzierung auf Matrigel™</b>	Wachstum in ausgebreiteten Kolonien mit Bildung von Ausläufern	Epithelartiges Wachstum, einzelne Zellen bilden Ausläufer	Bildung von Ausläufern in allen Richtungen, Verbindungen zu anderen Zellen	Weiterhin Bildung von Ausläufern in allen Richtungen, Verbindungen zu anderen Zellen

## IV Diskussion

### 1 RNAi-Technologie als Methode zur Analyse des Cytoskeletts in Tumorzellen

Viele Cytoskelettproteine wie z.B. Tropomyosin, Transgelin,  $\alpha$ -Actinin, Gelsolin oder Vinculin agieren als Tumorsuppressorproteine und weisen in Krebszellen einen reduzierten Expressionsspiegel im Vergleich zu normalen Zellen auf (Ben-Ze'ev, 1997).

Wie bereits erwähnt, wird Profilin I in Brustkrebszelllinien und in Brustkrebsgewebe reduziert exprimiert (Janke et al., 2000). Die Restauration des Profilinspiegels in der Brustkrebszelllinie CAL51 durch exogenes Profilin I führt zur Suppression der Tumorigenizität, damit besitzt Profilin I eine Tumorsuppressor-Aktivität (Janke et al., 2000). Wittenmayer und Mitarbeiter (2004) konnten zeigen, dass dafür die Aktin-Bindungsstelle im Profilin-Molekül notwendig ist. CAL51-Zellen, die das Profilin mit der Mutation R88L exprimieren, die eine reduzierte PIP<sub>2</sub>-Bindung aufweist, zeigten hingegen eine Supprimierung der tumorigenen Eigenschaften in Zellen (Wittenmayer et al., 2004).

Der Grund für die reduzierte Profilin-Expression in CAL51 Zellen ist nicht geklärt. Es wurden keine Mutationen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, gefunden. Lediglich eine Mutation in der 5'-Promotor-Region, die zu einer veränderten Bindung von Transkriptionsfaktoren führen und damit die Proteintranslation beeinflussen könnte, ist identifiziert worden (Janke et al., 2000).

Um hier weitere Erkenntnisse zu gewinnen, wurde der Profilin-Spiegel mit der RNAi-Technologie weiter gesenkt.

Die RNAi-Technologie hat sich in den letzten Jahren als eine sehr wichtige Methode erwiesen, um die Funktion von Proteinen in Säugertierzellen zu untersuchen.

Bakterien und einige niedrige Eukaryonten wie z. B. *Dictyostelium* sind haploid, daher führen Mutationen in der Regel zu einem veränderten Phänotyp dieser Organismen. Hier können deshalb normale Gene leicht durch die Einführung von mutierten Genen ersetzt werden. Auf diese Weise ist es möglich, Informationen über die Rolle von Proteinen zu gewinnen. Höhere Organismen wie Säuger sind diploid und besitzen zwei Kopien jedes Chromosoms. Darüber hinaus führt die Transfektion mit einem veränderten Gen normalerweise nicht zu einem Gen-Ersatz, sondern zu einer Gen-Addition. Das Gen wird zufällig in das Genom eingefügt, so dass die Zelle das mutierte Gen zusätzlich zu den normalen Gen-Kopien besitzt. Ein einfacher

Ersatz eines Genes ist daher in diploiden Organismen durch Mutagenese nicht zu erreichen (Alberts et al., 1995).

Die Funktion von Proteinen wurde deshalb traditionell mit Methoden wie der Deletion von Genen in „knock out“-Mäusen, der molekularen Charakterisierung einzelner Proteine oder durch Verwendung der Antisense-Technologie untersucht (Porter, 1998). Eine weitere Möglichkeit, die Rolle von Proteinen zu erforschen, besteht darin, die Proteine durch die Injektion von Antikörpern in die Zellen zu inaktivieren (Blangy et al., 1995).

Mittels RNA-Interferenz ist es heute möglich, die Funktion von Proteinen durch ein einfaches, schnelles und zuverlässiges Verfahren zu untersuchen. Dabei handelt es sich um einen post-transkriptionalen und sequenz-spezifischen Mechanismus zur Genunterdrückung. Durch diese Methode kann man in kurzer Zeit die gezielte Inaktivierung von Genen erreichen (Elbashir et al., 2001) und damit Schlüsse auf ihre Funktion auch in kultivierten Zellen höherer Organismen ziehen.

## **2 In CAL51-Zellen hat Profilin I eine sehr kurze Halbwertszeit**

In der vorliegenden Arbeit wurden CAL51-Zellen mit einem spezifischen siRNA-Duplex transfiziert (Harborth et al., 2001; Elbashir et al., 2002), um die Profilinexpression zu senken. Normale Brustepithelzellen, wie die MCF10A-Zellen, zeigten eine längere Halbwertszeit von Profilin I verglichen mit CAL51-Zellen. In CAL51-Zellen sank nämlich der Profilin Gehalt sehr schnell, nach 24 Stunden wurden nur noch 30% des Profilins nachgewiesen. Die Daten deuten auf eine Halbwertszeit von Profilin in CAL51-Zellen von höchstens 10 Stunden hin. Dies entspricht der Halbwertszeit von Cadherin, welche mit 5 bis 10 Stunden angegeben wird (McCrea und Gumbiner, 1991). Krebszellen können eine Dysregulierung von Prozessen wie z.B. der Proteinsynthese und der Proteindegradation aufweisen (Chauhan et al., 2005). Oft kommt es zu einer reduzierten Synthese eines Proteins bei gleichzeitig erhöhter Degradation (Tessitore et al., 1986). Die kurze Halbwertszeit von Profilin in CAL51-Zellen könnte auf eine fehlerhafte Regulierung des Protein-“turn over“ zurückgeführt werden, insbesondere da nicht-transformierte MCF10A-Zellen einen langsameren Abbau des Proteins im Vergleich zu CAL51-Zellen aufweisen. Viele andere Proteine, die eine regulatorische Rolle in der Zelle übernehmen oder als Tumorsuppressor-Proteine wirken, zeigen ebenfalls eine kurze Halbwertszeit. p53 besitzt beispielsweise eine Halbwertszeit von nur 10 bis 30 Minuten (Steinhoff, 2001), Geminin von 3 bis 4 Stunden (Kulartz et al., 2003). Hingegen besitzt  $\alpha$ -

Actinin, ein anderes cytoskelettales Protein, das Aktinfilamente vernetzt und damit stabilisiert, eine Halbwertszeit von 30-35 Stunden (Yao et al., 2004).

### **3 Das Absenken des Profilinsspiegels in CAL51-Zellen führt zu Apoptose und verändertem Cytoskelett**

Die Herunterregulierung von Profilin leitete in CAL51-Zellen die Apoptose ein. Außerdem zeigten die Zellen ein stark reduziertes Netz der Aktinfilamente, verglichen mit den nicht behandelten Zellen, sowie einen verringerten Aktingehalt. Hinzu kam eine Abnahme von Proteinen, wie z.B. von Vinculin, die an der Bildung von fokalen Kontakten beteiligt sind. RNAi-Versuche in HUVEC-Zellen (Ding et al., 2006) und in alveolaren Zellen (Bitko et al., 2003) zeigen ebenfalls, dass die Depletion von Profilin I zu einer Inhibition der Bildung von Stressfasern führt. In diesen beiden Zellsystemen konnte jedoch nicht nachgewiesen werden, dass der Aktingehalt abnimmt, oder dass Apoptose in diesen Zellen induziert wird. Diese Unterschiede könnten auf die verschiedenen verwendeten Zelltypen zurückzuführen sein.

Die Reduzierung des Profilin Gehaltes und die gleichzeitige Abnahme von Aktin sowie der Verlust von Vinculin führten zur Ablösung der CAL51-Zellen vom Substrat. Das Überleben von Brustepithel-Zellen ist aber von deren Adhäsion an das Substrat abhängig (Streuli und Gilmore, 1999). Lösen sich Epithelzellen aus der extrazellulären Matrix, wird eine besondere Form von Apoptose induziert, die Anoikis (Reddig und Juliano, 2005). Dies geschieht beispielsweise auch, wenn das Cytoskelett einer Zelle zerstört wird, wie im Fall einer Behandlung mit Cytochalasin oder Latrunculin (Cheng et al., 2004; Martin und Leder, 2001; White et al., 2001). White und Mitarbeiter (2001) konnten außerdem zeigen, dass die Depolymerisation des Aktin-Cytoskeletts auch zur Abnahme des Vinculingehaltes in epithelialen Zellen führt. Die Reduzierung des Vinculingehaltes in CAL51-Zellen nach RNAi-Behandlung könnte daher die Folge der Depolymerisation des Aktin-Cytoskeletts sein.

### **4 Das Anheben des endogenen Profilinsspiegels in CAL51-Zellen durch Mutanten kann das Zellwachstum normalisieren**

In der vorliegenden Arbeit wurde danach der Profilinsspiegel in CAL51 mit Mutanten angehoben. Dazu wurden Mutanten verwendet, die eine reduzierte Affinität für Aktin

(Schlüter et al., 1998) und PIP<sub>2</sub> (Sohn et al., 1995) besaßen. Die mRNA der verschiedenen Zellklone war gegenüber der RNAi-Behandlung resistent.

Die Mutante PFNI/AD zeigt *in vitro* eine vollständige Reduktion der Interaktion mit G-Aktin, während die Interaktion mit PIP<sub>2</sub>- oder Poly-L-Prolin-Liganden durch diese Mutation nicht beeinflusst ist.

Als Lipidbindungsmutante wurde in der Studie von Wittenmayer et al. (2004) R88L verwendet. Die Expression dieses rekombinanten Proteins reduziert die Tumorigenizität in Zellen, allerdings bildeten sich in Nacktmäusen noch kleine Tumore. Dieses Resultat könnte darauf beruhen, dass die zweite Bindungsstelle für PIP<sub>2</sub> im Profilin-Molekül nicht mutiert wurde. Für die vorliegende Arbeit wurde daher eine Doppelmutante benutzt, um eine viel stärkere Reduktion der Interaktion zu erzielen. Wie von Lambrechts et al. (2002) gezeigt wurde, weist PFNI/LD eine stark reduzierte Affinität für PIP<sub>2</sub> im Vergleich zu Wildtyp-Profilin auf. Die Affinität dieser Mutante für Aktin ist allerdings ebenfalls auf ein Drittel reduziert (Lambrechts et al., 2002), was mit den überlappenden Bindungsregionen von Aktin und PIP<sub>2</sub> zu erklären ist (Lassing und Lindberg, 1985). Die Wechselwirkung dieser Mutante mit Poly-L-Prolin wird ebenfalls beeinflusst (Lambrechts et al., 2002). Der Argininrest 136 ist im C-Terminus lokalisiert, wo sich auch die Bindungsstelle für die Poly-L-Prolin-Liganden befindet. Möglicherweise wird die Interaktion zwischen Profilin und den Poly-L-Prolin-Liganden durch eine Veränderung in der Konformation des Profilinmoleküls gestört (Lambrechts et al., 2002). Die Ergebnisse, die mit dieser Profilin-Mutante erzielt werden, müssen daher unter Berücksichtigung der verschiedenen Ligandenbindungsfähigkeiten betrachtet werden.

Nach dem Anheben des Profilinpiegels durch Transfektion mit Vektoren für entweder Wildtyp-Profilin oder PFNI/AD oder PFNI/LD ergab sich für alle im Immunblot charakterisierten Zellklone ein Gesamtprofilingehalt, der dem 1,1 bis 1,4-fachen Profilingehalt der Krebszelllinie entsprach. Im Vergleich mit der Epithelzelllinie MCF-10A (Gesamtprofilingehalt: 1,7-fach im Vergleich zu CAL51) und dem CAL17-5-Zellklon (Gesamtprofilingehalt: 1,5-fach im Vergleich zu CAL51) erreichten alle Zellklone einen Gesamtprofilingehalt, der vergleichbar mit dem Profilinspiegel von normalen Epithelzellen war. Daher können Effekte, die durch eine zu starke Überexpression der Profileine hervorgerufen werden, ausgeschlossen werden.

Besonders auffällig war die Tatsache, dass nur ein Zellklon isoliert wurde, der die PIP<sub>2</sub>-Bindungsmutante von Profilin exprimiert. Dieser Zellklon wies dazu eine niedrigere Expression des rekombinanten Proteins im Vergleich zu den anderen etablierten Zellklonen auf. Profilin/LD wird nur in geringen Mengen exprimiert, weil es möglicherweise durch die niedrige Affinität für PIP<sub>2</sub> unempfindlich gegenüber der Modulierung des Phospholipids wird. Eine geringere Interaktion zwischen Profilin und PIP<sub>2</sub> könnte auch dazu führen, wie Lambrechts et al. (2006) vermuten, dass die Zellen mehr Aktin-Profilin-Komplexe besitzen. Damit könnte die Aktinpolymerisation gefördert werden.

Die Expression von exogenem Wildtyp-Profilin und Profilinmutanten in CAL51-Zellen führte zu einer Verlängerung des Zellzyklus. Die CAL51-Zellen besaßen eine Generationszeit von 23 Stunden, die untersuchte Zellklone hingegen von bis zu 32 Stunden. Auch die Überexpression von mutiertem Profilin führte zu längeren Generationszeiten, wie schon von Wittenmayer (2003) gezeigt, und dies sowohl bei den Zellklonen mit Defekten der Aktin- als auch der PIP<sub>2</sub>-Bindung von Profilin.

Dieser Effekt kann als Normalisierung des Zellwachstums durch Profilin interpretiert werden, da Krebszellen sich in vielen Fällen von normalen Zellen auch durch ein unkontrolliertes Wachstum und kürzere Generationszeiten unterscheiden. Im Falle der hier untersuchten Zellklone konnte auch eine epitheliale Differenzierung auf Matrigel beobachtet werden.

## **5 Der Effekt der RNAi-Behandlung auf die CAL51-Zellderivate ist abhängig von der Profilinmutante**

Die Behandlung der Zellklone, die die beschriebenen Mutanten exprimieren, mit RNAi führte zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die Zellen des PFNI/AD-Klons traten nach RNAi-Behandlung in die Apoptose ein, ebenso wie die nicht transformierten CAL51-Zellen. Die Expression von Profilin/AD zeigte damit keinen „rescue“-Effekt. Ferner wurde auch für den PFNI/LD-Klon eine leicht erhöhte Apoptose gemessen. Der Effekt auf den PFNI/LD-Klon könnte auf die Tatsache zurückzuführen sein, dass diese Mutante eine reduzierte Bindung sowohl zu den Poly-L-Prolin-Liganden als auch zum Aktin aufweist.

Für Hefen konnte gezeigt werden, dass eine 10%ige Restaffinität des PFNI gegenüber Aktin notwendig ist, damit die Zellen überleben können (Lu und Pollard, 2001). Die Expression der auch in der vorliegenden Arbeit verwendeten Profilinmutante in Profilin-defizienten *Dictiostelium*-Zellen ergab im Vergleich zum Wildtyp-Profilin stark verminderte „rescue“-



Effekte (Schlüter et al., 1998). RNAi-Versuche in PC12-Zellen, die ein Profilin mit einer reduzierten Aktin-Bindung exprimieren, zeigen ebenfalls, dass die Profilin-Aktin-Interaktion für die Adhäsion und das Überleben von Zellen essentiell ist (Lambrechts et al., 2006). Nach Injektion in Fibroblastenzellen konnten Aktinbindungsmutanten von Profilin aus der Hefe keine Umorganisation des Aktin-Cytoskeletts bewirken, wozu Wildtyp-Profilin in der Lage ist (Hajkova et al., 1997). Dies ist ein weiterer Beweis, dass Profilin die Organisation des Aktin-Cytoskeletts durch seine direkte Interaktion mit G-Aktin kontrolliert. Ist die Aktinbindungsfähigkeit von Profilin gestört, so haben die Zellen Probleme, aktinbasierende Prozesse auszuführen. Als weiterer Ligand für die Aktin-Bindungsregion des Profilins ist die Untereinheit Arp2 des Arp2/3-Komplexes beschrieben. Der Verlust der Interaktion von Profilin mit diesem Protein könnte auch die Ursache für die Apoptose in CAL51-Zellen sein. Hierbei spielt die Bindung von Profilin an Arp2 eine ähnlich tragende Rolle wie die Bindung an G-Aktin. Der Arp2/3-Komplex kann neue Aktinfilamente nukleieren und an bestehenden Filamenten Verzweigungen induzieren (Mullins und Pollard, 1999). Wenn Profilin aufgrund seiner Mutation nicht mehr an Arp2 binden kann, so geht die Effizienz der Aktinfilamentbildung verloren.

Welche gestörte Interaktion, ob die mit G-Aktin oder die mit dem Arp2/3-Komplex, ausschlaggebend ist, kann an dieser Stelle nicht eindeutig gesagt werden.

Nach der Bestimmung der Apoptoserate wurde untersucht, wie die RNAi-Behandlung der Zellen die Expression des Profilins beeinflusste. Die Expressionsrate der Proteine wurde im Immunblot über einen Zeitraum von sechs Tagen verfolgt. Untersuchungen zu einem späteren Zeitpunkt als 144 Stunden waren nicht möglich, da die Zellen bereits konfluent waren. Eine Umsetzung der Zellen wurde nicht unternommen, weil dies zu einer Selektion von Zellen z.B. mit einer höheren Proliferationsrate oder mit veränderten Adhäsionsfähigkeiten geführt haben könnte. Somit wären die umgesetzten Zellen nicht mehr für die ganze Zellpopulation repräsentativ gewesen (Vollmann, 2004).

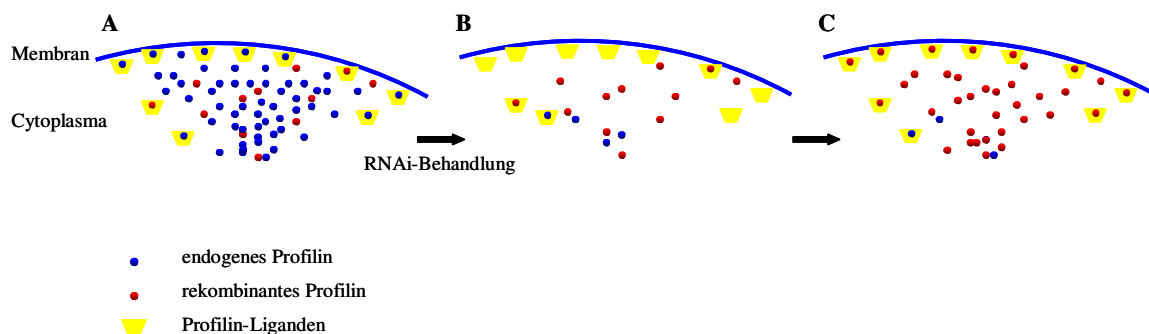
## **6 Nach RNAi-Behandlung steigt der rekombinante PFNI-Gehalt**

Die Resultate zeigten, dass der Gehalt des endogenen Proteins durch die RNAi-Behandlung stark reduziert wurde. Die Analyse der Expression des rekombinanten Proteins zeigte hingegen eine Zunahme des Gehaltes des exogenen Profilins. Beim PFNI/WT-Klon wurde schon nach 48 Stunden eine Erhöhung des exogenen Profilingehaltes um das 2,4-fache

beobachtet, während beim PFNI/LD-Klon eine Steigerung um das 2,2-fache erst nach 96 Stunden stattfand. Danach stabilisierte sich die Menge des rekombinanten Profilins beim PFNI/WT-Klon, wobei beim PFNI/LD-Klon ein weiterer Anstieg gemessen wurde. 144 Stunden nach RNAi-Behandlung war, verglichen zum Zeitpunkt  $t = 0$ , die 3,6-fache Menge des rekombinanten Profilins vorhanden.

Eine mögliche Ursache für die Zunahme des Gehaltes an rekombinantem Protein könnte in einer erhöhten Transkriptionsrate liegen. Diese würde zu einer Steigerung der mRNA-Menge des rekombinanten Proteins führen. Deshalb wurde mittels „Real Time PCR“-Analysen die Quantifizierung der mRNA-Menge der Profileine unternommen. Die Auswertung der Daten zeigte, dass die mRNA-Menge des nativen Profilins stark reduziert war. Gleichzeitig wurde nachgewiesen, dass die mRNA-Menge des rekombinanten Proteins stabil blieb. Somit konnte ausgeschlossen werden, dass der Anstieg des Gehaltes des exogenen Proteins mit einer höheren Transkriptionsrate auf mRNA-Ebene verbunden war. Die Erhöhung des Gehaltes des exogenen Profilins könnte dann entweder mit einer höheren Translationsrate des Proteins oder mit einem geringeren Abbau des Proteins erklärt werden.

Ein Modellvorschlag für einen möglichen Mechanismus, der für den Anstieg des exogenen Profilins verantwortlich ist, ist in Abbildung 33 dargestellt.



**Abb. 33: Modellvorschlag zur Erklärung der Erhöhung des rekombinanten Profilinspiegels.**

In den Zellklonen, die überwiegend endogenes Profilin enthalten, verteilen sich das endogene und das rekombinante Profilin im Cytoplasma gleichmäßig (A). Nach der RNAi-Behandlung wird das native Protein abgebaut (B), und in der Zelle befindet sich nur das rekombinante Profilin. Die Moleküle des rekombinanten Proteins können an die Liganden binden und sich akkumulieren. Dadurch erhöht sich der Proteingehalt des rekombinanten Proteins (C).

Die RNAi-Behandlung reduziert stark die Menge der mRNA des endogenen Profilins, so dass kein neues Protein synthetisiert werden kann. Das vorhandene Protein wird abgebaut und folglich der Profilengehalt reduziert (Abb. 33B). Die Translationsrate des rekombinanten

Profilins, dessen mRNA-Menge von der RNAi-Behandlung nicht beeinflusst wird, könnte daraufhin erhöht werden. Außerdem könnte das rekombinante Protein z.B. mit Poly-L-Prolin-Liganden interagieren (Abb. 33C). Durch diese Interaktion könnte das rekombinante Profilin akkumuliert werden, sodass das Protein nicht mehr so schnell abgebaut werden kann.

## **7 PFNI/LD beeinflusst Adhäsion und Migration von CAL51-Zellklonen**

Die Adhäsion von Zellen an die extrazelluläre Matrix und an benachbarte Zellen spielt eine große Rolle für komplexe biologische Abläufe wie die Motilität, das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Zellen (Ben-Ze'ev, 1997). Im Metastasierungsprozess von Krebszellen werden Kontakte zu Nachbarzellen zerstört, die Krebszellen wandern in Blutgefäße ein und dringen an entfernten Orten in andere Gewebe ein. Dort können sie sich anheften und Metastasen bilden. Diese Prozesse benötigen den Auf- und Abbau von Zell-Zell- und Zell-Matrix-Kontakten (Price et al., 1997). Die Abnahme der Adhäsionsfähigkeit an das Substrat oder an Nachbarzellen, welche mit einer veränderten Expressionsrate von Integrinen, Cadherinen und auch Cytoskelettproteinen verbunden ist, charakterisiert Tumorzellen (Ben-Ze'ev, 1997; Parish et al., 1987).

Durch den „wounding assay“ wurde nachgewiesen, dass Zellen, die ausschließlich PFNI/LD exprimieren, im Vergleich zur Kontrolle und zu den Zellen des PFNI/WT-Klons deutlich schneller migrieren können, unabhängig von der verwendeten Matrix.

Die Analyse des Absetzverhaltens der Zellklone zeigte eine höhere Anzahl an abgesetzten Zellen im Vergleich zu CAL51-Zellen. Der Zellklon PFNI/WT wies nur bei den Zellen, die auf unbeschichteten Deckgläsern ausgesät wurden, eine Erhöhung der Absetzrate auf.

Die Zellen des PFNI/LD-Klons zeigten auf unbeschichteter Oberfläche, Laminin und Poly-L-Lysin eine erhöhte Fähigkeit, sich abzusetzen. Diese korrelierte mit der Zunahme der Profilin-Expression mit stark reduzierter PIP<sub>2</sub>-Bindung. Der „spreading assay“ zeigte außerdem, dass die Zellen, die ausschließlich das rekombinante Protein PFNI/LD exprimieren, sich im Vergleich zur Kontrolle schneller auf Fibronectin und unbeschichteter Oberfläche ausbreiten können. Dies bestätigt die Ergebnisse früherer Studien. Wittenmayer und Mitarbeiter (2004) konnten nachweisen, dass die stabile Expression einer Profilinmutante mit einer defekten PIP<sub>2</sub>-Bindung (PFNI/R88L) die Ausbreitungsrate der Zellklone, verglichen mit Zellen, die PFNI/WT exprimieren, erhöht. In PC12-Zellen wurde ebenfalls gezeigt, dass die Interaktion zwischen Profilin und PIP<sub>2</sub> das Ausbreitungsverhalten von Zellen beeinflusst. Die

Überexpression der Profilinmutante PFNI/R136D führt zu einer erhöhten Ausbreitungsfläche der Zellen im Vergleich zu PFNI/WT-exprimierenden Zellen (Lambrechts et al., 2006).

Alle diese Daten weisen darauf hin, dass die Bindung von Profilin an PIP<sub>2</sub> eine entscheidende Rolle in der Modulierung der Aktindynamik spielt.

## **8 Die Bedeutung der Interaktion von Profilin mit PIP<sub>2</sub>**

Das Phospholipid PIP<sub>2</sub> ist an der Regulation des Aktin-Cytoskeletts beteiligt (Toker, 1998). Profilin und PIP<sub>2</sub> sind an der Plasmamembran in Bereichen hoher Aktindynamik lokalisiert (Buss et al., 1992; Tall et al., 2000), so dass PIP<sub>2</sub> eine große Rolle für die zeitliche Bereitstellung von Profilin spielt. Weiterhin befinden sich in Bereichen der Zellmembran stabile „patches“, die sowohl eine Anreicherung von PIP<sub>2</sub> als auch eine hohe Konzentration von polymerisiertem Aktin aufweisen (Huang et al., 2004).

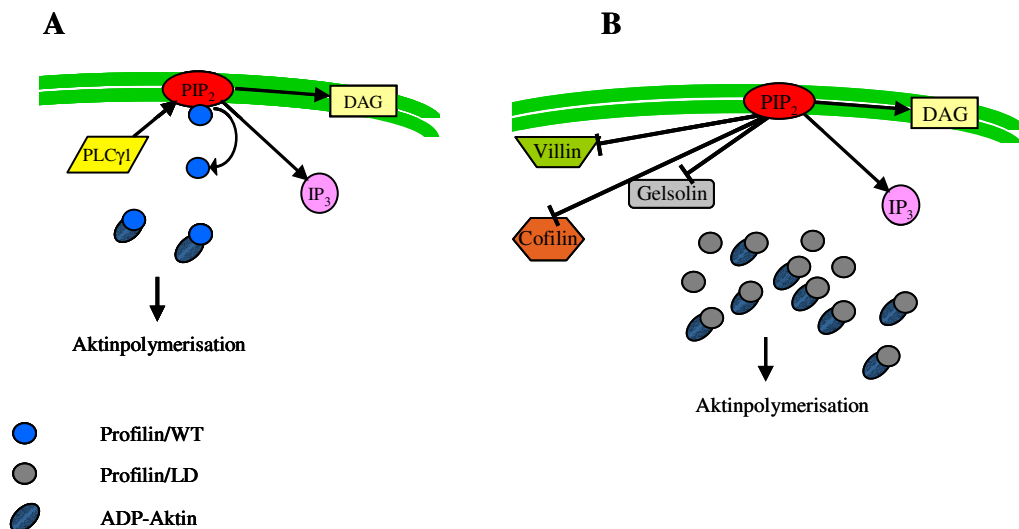
Die Modulierung durch PIP<sub>2</sub> ist, wie viele Befunde belegen, für die Aktindynamik in Zellen entscheidend. Das Protein Phosphoinositid-5-Kinase (PI5K), welches an der Synthese von PIP<sub>2</sub> beteiligt ist, gilt als Hauptregulator des Aktin-Cytoskeletts. Eine Überexpression dieser Kinase zeigt eine dramatische Erhöhung der Aktinpolymerisation in COS7-Zellen (Shibasaki et al., 1997). Hingegen beeinträchtigt die Senkung der PIP<sub>2</sub>-Konzentration die Organisation von Stressfasern. Die Injektion von spezifischen Antikörpern, die mit PIP<sub>2</sub> interagieren (Gilmore und Burridge, 1996), sowie die Überexpression von Synaptojanin (Sakisaka et al., 1997), einer Phosphatase, die im Bereich der Zellmembran die Konzentration von PIP<sub>2</sub> reguliert (Cremona et al., 1999), führen zur Reduktion des Organisationsgrades der Stressfasern.

Die in dieser Arbeit gewonnenen Resultate bestätigen, dass die Interaktion von Profilin und PIP<sub>2</sub> die Aktindynamik moduliert. Die RNAi-behandelten Zellen des PFNI/LD-Klons konnten schneller adhärieren, sich teilweise schneller ausbreiten und sie bildeten weniger Kolonien im Softagar. Weiterhin besaßen die Zellen eine höhere lokomotorische Aktivität, wie im „wounding assay“ gezeigt wurde.

In Abbildung 34 ist schematisch die Wirkung der Interaktion zwischen PIP<sub>2</sub> und PFNI/WT (A) und PFNI/LD (B) dargestellt. Wenn die Wechselwirkung zwischen Profilin und PIP<sub>2</sub> nicht mehr stattfindet, steht mehr Profilin für die Aktinpolymerisation zur Verfügung (Abb. 34B). Weiterhin kann der höhere Anteil an freiem PIP<sub>2</sub> die Aktivität anderer Proteine, wie Gelsolin, Cofilin und Villin, beeinflussen. Das Phospholipid kann direkt mit diesen Proteinen,

die F-Aktin depolymerisieren, interagieren und sie inaktivieren (Yamamoto et al., 2001; Yonezawa et al., 1991; Kumar et al., 2004).

Außerdem könnte die erhöhte Aktindynamik dazu beitragen, dass die Zellen des PFNI/LD-Klons trotz eines sehr geringen Gesamtprofilinspiegels nach der RNAi-Behandlung überleben konnten. Weiterhin lassen die Daten die Vermutung zu, dass dieses Profilin lokal zu einer Erhöhung der  $\text{PIP}_2$ -Konzentration führt, was wiederum die Adhäsion und das „spreading“-Verhalten der Zellen beeinflussen könnte.



**Abb. 34: Schematische Darstellung der Effekte der Interaktion zwischen  $\text{PIP}_2$  und PFNI/WT und PFNI/LD.**

PFNI und  $\text{PIP}_2$  interagieren miteinander im Bereich der Zellmembran (A). Wenn es zur Spaltung zwischen PFNI und  $\text{PIP}_2$  durch die Aktivität der Phospholipase  $\text{C}\gamma$  kommt, kann das freigesetzte Profilin die Aktinpolymerisation fördern. Bindet jedoch Profilin nicht mehr  $\text{PIP}_2$  (B), kann die Aktinpolymerisation durch den höheren Anteil freien Profilins beschleunigt werden. Zudem kann der höhere Anteil an freiem  $\text{PIP}_2$  Proteine wie Gelsolin, Villin und Cofilin inaktivieren, die F-Aktin depolymerisieren.

Aus diesen Resultaten entsteht ein komplexes Bild, in dem verschiedene Komponenten eine entscheidende Rolle spielen. Alle Ergebnisse zeigen aber, dass der Verlust der  $\text{PIP}_2$ -Bindung im Profilin-Molekül die Aktindynamik stark beeinflusst.

## 9 Ausblick

Die in dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse bestätigen, dass Profilin ein für Brustepithelzellen essentielles Protein ist. Die Interaktion zwischen Aktin und Profilin ist notwendig, damit die Zellen überleben können. In dieser Arbeit wurde außerdem gezeigt, dass eine vollständige Suppression der Interaktion zwischen Aktin und Profilin zur Apoptose führt. Um die Rolle dieser Bindung weiter zu charakterisieren, könnten stabile Zellklone generiert werden, die eine Bindungsmutante von Profilin exprimieren, welche nur eine partiell reduzierte Affinität für Aktin aufweist. Somit könnte die Rolle dieser Wechselwirkung genauer aufgeklärt werden.

Eine wichtige Rolle für die Modulierung des Aktin-Cytoskeletts spielt die Bindung von Profilin I an das Lipid  $\text{PIP}_2$ . Die Analyse der Zellklone war aber nur für einen Zeitraum von sechs Tagen möglich. Für die Durchführung von Langzeitversuchen, wie z.B. die Untersuchung der Tumorbildung in der Nacktmaus, sollte die Vektor-basierte RNAi-Methode verwendet werden. Diese Technik ermöglicht die Herstellung von Zellklonen, die stabil eine stark reduzierte Expression eines Proteins aufweisen. Damit könnte auch untersucht werden, ob die verschiedenen Profilin-Isoformen in ihrer Aktivität austauschbar sind. Bislang ist es nicht gelungen, stabile Zellklone herzustellen, die über längere Zeit z.B. Profilin IIa exprimieren.

## V Literaturverzeichnis

Ackermann, M., and Matus, A. (2003). Activity-induced targeting of profilin and stabilization of dendritic spine morphology. *Nat Neurosci* 6, 1194-1200.

Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Watson, J. D. (1995). *Molekularbiologie der Zelle*. VCH 3. Auflage.

Ayscough, K. R. (1998). In vivo functions of actin-binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 10, 102-111.

Balasubramanian, M. K., Hirani, B. R., Burke, J. D., and Gould, K. L. (1994). The *Schizosaccharomyces pombe cdc3+* gene encodes a profilin essential for cytokinesis. *J Cell Biol* 125, 1289-1301.

Ben-Ze'ev, A. (1997). Cytoskeletal and adhesion proteins as tumor suppressors. *Curr Opin Cell Biol* 9, 99-108.

Binette, F., Benard, M., Laroche, A., Pierron, G., Lemieux, G., and Pallotta, D. (1990). Cell-specific expression of a profilin gene family. *DNA Cell Biol* 9, 323-334.

Bitko, V., Oldenburg, A., Garmon, N. E., and Barik, S. (2003). Profilin is required for viral morphogenesis, syncytium formation, and cell-specific stress fiber induction by respiratory syncytial virus. *BMC Microbiol* 3, 9.

Blangy, A., Lane, H. A., d'Herin, P., Harper, M., Kress, M., and Nigg, E. A. (1995). Phosphorylation by p34cdc2 regulates spindle association of human Eg5, a kinesin-related motor essential for bipolar spindle formation in vivo. *Cell* 83, 1159-1169.

Boukhelifa, M., Moza, M., Johansson, T., Rachlin, A., Parast, M., Huttelmaier, S., Roy, P., Jockusch, B. M., Carpen, O., Karlsson, R., and Otey, C. A. (2006). The proline-rich protein palladin is a binding partner for profilin. *Febs J* 273, 26-33.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.

Braun, A., Aszodi, A., Hellebrand, H., Berna, A., Fassler, R., and Brandau, O. (2002). Genomic organization of profilin-III and evidence for a transcript expressed exclusively in testis. *Gene* 283, 219-225.

Bullock, W. O., Fernandez, J. M. and Short, J. M. (1987). *From Genes to clones: An introduction to gene technology*. Weinheim:VHC

Buss, F., Temm-Grove, C., Henning, S., and Jockusch, B. M. (1992). Distribution of profilin in fibroblasts correlates with the presence of highly dynamic actin filaments. *Cell Motil Cytoskeleton* 22, 51-61.

Button, E., Shapland, C., and Lawson, D. (1995). Actin, its associated proteins and metastasis. *Cell Motil Cytoskeleton* 30, 247-251.

- Carlier, M. F. (1991). Actin: protein structure and filament dynamics. *J Biol Chem* 266, 1-4.
- Carlier, M. F., Jean, C., Rieger, K. J., Lenfant, M., and Pantaloni, D. (1993). Modulation of the interaction between G-actin and thymosin beta 4 by the ATP/ADP ratio: possible implication in the regulation of actin dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 5034-5038.
- Carlsson, L., Nystrom, L. E., Sundkvist, I., Markey, F., and Lindberg, U. (1977). Actin polymerizability is influenced by profilin, a low molecular weight protein in non-muscle cells. *J Mol Biol* 115, 465-483.
- Chauhan, D., Hideshima, T., Mitsiades, C., Richardson, P., and Anderson, K. C. (2005). Proteasome inhibitor therapy in multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 4, 686-692.
- Chen, C. L., Liu, S. S., Ip, S. M., Wong, L. C., Ng, T. Y., and Ngan, H. Y. (2003). E-cadherin expression is silenced by DNA methylation in cervical cancer cell lines and tumours. *Eur J Cancer* 39, 517-523.
- Cheng, T. L., Symons, M., and Jou, T. S. (2004). Regulation of anoikis by Cdc42 and Rac1. *Exp Cell Res* 295, 497-511.
- Condeelis, J. (2001). How is actin polymerization nucleated in vivo? *Trends Cell Biol* 11, 288-293.
- Cooley, L., Verheyen, E., and Ayers, K. (1992). chickadee encodes a profilin required for intercellular cytoplasm transport during *Drosophila* oogenesis. *Cell* 69, 173-184.
- Cremona, O., Di Paolo, G., Wenk, M. R., Luthi, A., Kim, W. T., Takei, K., Daniell, L., Nemoto, Y., Shears, S. B., Flavell, R. A., *et al.* (1999). Essential role of phosphoinositide metabolism in synaptic vesicle recycling. *Cell* 99, 179-188.
- Di Nardo, A., Gareus, R., Kwiatkowski, D., and Witke, W. (2000). Alternative splicing of the mouse profilin II gene generates functionally different profilin isoforms. *J Cell Sci* 113, 3795-3803.
- Ding, Z., Lambrechts, A., Parepally, M., and Roy, P. (2006). Silencing profilin-1 inhibits endothelial cell proliferation, migration and cord morphogenesis. *J Cell Sci* 119, 4127-4137.
- dos Remedios, C. G., Chhabra, D., Kekic, M., Dedova, I. V., Tsubakihara, M., Berry, D. A., and Nosworthy, N. J. (2003). Actin binding proteins: regulation of cytoskeletal microfilaments. *Physiol Rev* 83, 433-473.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Lendeckel, W., Yalcin, A., Weber, K., and Tuschl, T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 411, 494-498.
- Elbashir, S. M., Harborth, J., Weber, K., and Tuschl, T. (2002). Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* 26, 199-213.
- Essrich, C., Lorez, M., Benson, J. A., Fritschy, J. M., and Luscher, B. (1998). Postsynaptic clustering of major GABAA receptor subtypes requires the gamma 2 subunit and gephyrin. *Nat Neurosci* 1, 563-571.



- Evangelista, M., Blundell, K., Longtine, M. S., Chow, C. J., Adames, N., Pringle, J. R., Peter, M., and Boone, C. (1997). Bni1p, a Yeast Formin Linking Cdc42p and the Actin Cytoskeleton During Polarized Morphogenesis. *Science* 276, 118-122.
- Evans, N. J., and Walker, J. W. (2006). Endothelin-1 mobilizes profilin-1-bound PIP2 in cardiac muscle. *Exp Biol Med* (Maywood) 231, 882-887.
- Fedorov, A. A., Magnus, K. A., Graupe, M. H., Lattman, E. E., Pollard, T. D., and Almo, S. C. (1994). X-ray structures of isoforms of the actin-binding protein profilin that differ in their affinity for phosphatidylinositol phosphates. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 8636-8640.
- Fidler, I. J., Gersten, D. M., and Hart, I. R. (1978). The biology of cancer invasion and metastasis. *Adv Cancer Res* 28, 149-250.
- Gareus, R., Di Nardo, A., Rybin, V., and Witke, W. (2006). Mouse profilin 2 regulates endocytosis and competes with SH3 ligand binding to dynamin 1. *J Biol Chem* 281, 2803-2811.
- Gertler, F. B., Niebuhr, K., Reinhard, M., Wehland, J., and Soriano, P. (1996). Mena, a relative of VASP and Drosophila Enabled, is implicated in the control of microfilament dynamics. *Cell* 87, 227-239.
- Giesemann, T., Rathke-Hartlieb, S., Rothkegel, M., Bartsch, J. W., Buchmeier, S., Jockusch, B. M., and Jockusch, H. (1999). A role for polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem* 274, 37908-37914.
- Giesemann, T., Schwarz, G., Nawrotzki, R., Berhorster, K., Rothkegel, M., Schluter, K., Schrader, N., Schindelin, H., Mendel, R. R., Kirsch, J., and Jockusch, B. M. (2003). Complex formation between the postsynaptic scaffolding protein gephyrin, profilin, and Mena: a possible link to the microfilament system. *J Neurosci* 23, 8330-8339.
- Gilmore, A. P., and Burridge, K. (1996). Regulation of vinculin binding to talin and actin by phosphatidyl-inositol-4-5-bisphosphate. *Nature* 381, 531-535.
- Gioanni, J., Le Francois, D., Zanghellini, E., Mazeau, C., Ettore, F., Lambert, J. C., Schneider, M., and Dutrillaux, B. (1990). Establishment and characterisation of a new tumorigenic cell line with a normal karyotype derived from a human breast adenocarcinoma. *Br J Cancer* 62, 8-13.
- Gluck, U., Kwiatkowski, D. J., and Ben-Ze'ev, A. (1993). Suppression of tumorigenicity in simian virus 40-transformed 3T3 cells transfected with alpha-actinin cDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 383-387.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Furman, M. I., Wachsstock, D., Safer, D., Nachmias, V. T., and Pollard, T. D. (1992). The control of actin nucleotide exchange by thymosin beta 4 and profilin. A potential regulatory mechanism for actin polymerization in cells. *Mol Biol Cell* 3, 1015-1024.
- Goldschmidt-Clermont, P. J., Kim, J. W., Machesky, L. M., Rhee, S. G., and Pollard, T. D. (1991). Regulation of phospholipase C-gamma 1 by profilin and tyrosine phosphorylation. *Science* 251, 1231-1233.

- Goldschmidt-Clermont, P. J., Machesky, L. M., Baldassare, J. J., and Pollard, T. D. (1990). The actin-binding protein profilin binds to PIP2 and inhibits its hydrolysis by phospholipase C. *Science* 247, 1575-1578.
- Haarer, B. K., and Brown, S. S. (1990). Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton* 17, 71-74.
- Haffner, C., Jarchau, T., Reinhard, M., Hoppe, J., Lohmann, S. M., and Walter, U. (1995). Molecular cloning, structural analysis and functional expression of the proline-rich focal adhesion and microfilament-associated protein VASP. *Embo J* 14, 19-27.
- Hajkova, L., Bjorkegren Sjogren, C., Korenbaum, E., Nordberg, P., and Karlsson, R. (1997). Characterization of a mutant profilin with reduced actin-binding capacity: effects in vitro and in vivo. *Exp Cell Res* 234, 66-77.
- Harborth, J., Elbashir, S. M., Bechert, K., Tuschl, T., and Weber, K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci* 114, 4557-4565.
- Haugwitz, M., Noegel, A. A., Rieger, D., Lottspeich, F., and Schleicher, M. (1991). Dictyostelium discoideum contains two profilin isoforms that differ in structure and function. *J Cell Sci* 100 ( Pt 3), 481-489.
- Hille, R. (1996). The Mononuclear Molybdenum Enzymes. *Chem Rev* 96, 2757-2816.
- Honore, B., Madsen, P., Andersen, A. H., and Leffers, H. (1993). Cloning and expression of a novel human profilin variant, profilin II. *FEBS Lett* 330, 151-155.
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., and Zhu, Y. (2001). Molecular cloning and characterization of profilin-3: a novel cytoskeleton-associated gene expressed in rat kidney and testes. *Exp Nephrol* 9, 265-274.
- Huang, S., Lifshitz, L., Patki-Kamath, V., Tuft, R., Fogarty, K., and Czech, M. P. (2004). Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-rich plasma membrane patches organize active zones of endocytosis and ruffling in cultured adipocytes. *Mol Cell Biol* 24, 9102-9123.
- Hunter, T. (1991). Cooperation between oncogenes. *Cell* 64, 249-270.
- Imamura, H., Tanaka, K., Hihara, T., Umikawa, M., Kamei, T., Takahashi, K., Sasaki, T., and Takai, Y. (1997). Bni1p and Bnr1p: downstream targets of the Rho family small G-proteins which interact with profilin and regulate actin cytoskeleton in *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J* 16, 2745-2755.
- Janke, J., Schluter, K., Jandrig, B., Theile, M., Kolble, K., Arnold, W., Grinstein, E., Schwartz, A., Estevez-Schwarz, L., Schlag, P. M., *et al.* (2000). Suppression of tumorigenicity in breast cancer cells by the microfilament protein profilin 1. *J Exp Med* 191, 1675-1686.
- Kabsch, W., Mannherz, H. G., Suck, D., Pai, E. F., and Holmes, K. C. (1990). Atomic structure of the actin:DNase I complex. *Nature* 347, 37-44.
- Kaiser, D. A., Sato, M., Ebert, R. F., and Pollard, T. D. (1986). Purification and characterization of two isoforms of *Acanthamoeba* profilin. *J Cell Biol* 102, 221-226.

- Kirsch, J., Wolters, I., Triller, A., and Betz, H. (1993). Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature* 366, 745-748.
- Kleinman, H. K., McGarvey, M. L., Liotta, L. A., Robey, P. G., Tryggvason, K., and Martin, G. R. (1982). Isolation and characterization of type IV procollagen, laminin, and heparan sulfate proteoglycan from the EHS sarcoma. *Biochemistry* 21, 6188-6193.
- Krebs, A., Rothkegel, M., Klar, M., and Jockusch, B. M. (2001). Characterization of functional domains of mDia1, a link between the small GTPase Rho and the actin cytoskeleton. *J Cell Sci* 114, 3663-3672.
- Kulartz, M., Kreitz, S., Hiller, E., Damoc, E. C., Przybylski, M., and Knippers, R. (2003). Expression and phosphorylation of the replication regulator protein geminin. *Biochem Biophys Res Commun* 305, 412-420.
- Kumar, N., Zhao, P., Tomar, A., Galea, C. A., and Khurana, S. (2004). Association of villin with phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate regulates the actin cytoskeleton. *J Biol Chem* 279, 3096-3110.
- Kwiatkowski, D. J., Aklog, L., Ledbetter, D. H., and Morton, C. C. (1990). Identification of the functional profilin gene, its localization to chromosome subband 17p13.3, and demonstration of its deletion in some patients with Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet* 46, 559-567.
- Kwiatkowski, D. J., and Bruns, G. A. (1988). Human profilin. Molecular cloning, sequence comparison, and chromosomal analysis. *J Biol Chem* 263, 5910-5915.
- Lambrechts, A., Braun, A., Jonckheere, V., Aszodi, A., Lanier, L. M., Robbens, J., Van Colen, I., Vandekerckhove, J., Fassler, R., and Ampe, C. (2000). Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol Cell Biol* 20, 8209-8219.
- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Dewitte, D., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (2002). Mutational analysis of human profilin I reveals a second PI(4,5)-P2 binding site neighbouring the poly(L-proline) binding site. *BMC Biochem* 3, 12.
- Lambrechts, A., Jonckheere, V., Peleman, C., Polet, D., De Vos, W., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (2006). Profilin-I-ligand interactions influence various aspects of neuronal differentiation. *J Cell Sci* 119, 1570-1578.
- Lambrechts, A., van Damme, J., Goethals, M., Vandekerckhove, J., and Ampe, C. (1995). Purification and characterization of bovine profilin II. Actin, poly(L-proline) and inositolphospholipid binding. *Eur J Biochem* 230, 281-286.
- Lamprecht, R., Farb, C. R., Rodrigues, S. M., and LeDoux, J. E. (2006). Fear conditioning drives profilin into amygdala dendritic spines. *Nat Neurosci* 9, 481-483.
- Lassing, I., and Lindberg, U. (1985). Specific interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and profilactin. *Nature* 314, 472-474.
- Lassing, I., and Lindberg, U. (1988). Specificity of the interaction between phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate and the profilin:actin complex. *J Cell Biochem* 37, 255-267.

- Laurent, V., Loisel, T. P., Harbeck, B., Wehman, A., Grobe, L., Jockusch, B. M., Wehland, J., Gertler, F. B., and Carlier, M. F. (1999). Role of proteins of the Ena/VASP family in actin-based motility of *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol* 144, 1245-1258.
- Lederer, M., Jockusch, B. M., and Rothkegel, M. (2005). Profilin regulates the activity of p42POP, a novel Myb-related transcription factor. *J Cell Sci* 118, 331-341.
- Lefebvre, S., Burglen, L., Reboullet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Millasseau, P., Zeviani, M., and et al. (1995). Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80, 155-165.
- Leung, W. K., Yu, J., Bai, A. H., Chan, M. W., Chan, K. K., To, K. F., Chan, F. K., Ng, E. K., Chung, S. C., and Sung, J. J. (2003). Inactivation of helicase-like transcription factor by promoter hypermethylation in human gastric cancer. *Mol Carcinog* 37, 91-97.
- Lu, J., and Pollard, T. D. (2001). Profilin binding to poly-L-proline and actin monomers along with ability to catalyze actin nucleotide exchange is required for viability of fission yeast. *Mol Biol Cell* 12, 1161-1175.
- Lu, P. J., Shieh, W. R., Rhee, S. G., Yin, H. L., and Chen, C. S. (1996). Lipid products of phosphoinositide 3-kinase bind human profilin with high affinity. *Biochemistry* 35, 14027-14034.
- Machesky, L. M., and Poland, T. D. (1993). Profilin as a potential mediator of membrane-cytoskeleton communication. *Trends Cell Biol* 3, 381-385.
- Machesky, L. M., Atkinson, S. J., Ampe, C., Vandekerckhove, J., and Pollard, T. D. (1994). Purification of a cortical complex containing two unconventional actins from *Acanthamoeba* by affinity chromatography on profilin-agarose. *J Cell Biol* 127, 107-115.
- Machesky, L. M., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Pollard, T. D. (1990). The affinities of human platelet and *Acanthamoeba* profilin isoforms for polyphosphoinositides account for their relative abilities to inhibit phospholipase C. *Cell Regul* 1, 937-950.
- Mammoto, A., Sasaki, T., Asakura, T., Hotta, I., Imamura, H., Takahashi, K., Matsuura, Y., Shirao, T., and Takai, Y. (1998). Interactions of drebrin and gephyrin with profilin. *Biochem Biophys Res Commun* 243, 86-89.
- Manseau, L., Calley, J., and Phan, H. (1996). Profilin is required for posterior patterning of the *Drosophila* oocyte. *Development* 122, 2109-2116.
- Martin, S. S., and Leder, P. (2001). Human MCF10A mammary epithelial cells undergo apoptosis following actin depolymerization that is independent of attachment and rescued by Bcl-2. *Mol Cell Biol* 21, 6529-6536.
- Matsumura, F., Lin, J. J., Yamashiro-Matsumura, S., Thomas, G. P., and Topp, W. C. (1983). Differential expression of tropomyosin forms in the microfilaments isolated from normal and transformed rat cultured cells. *J Biol Chem* 258, 13954-13964.
- Mayboroda, O., Schluter, K., and Jockusch, B. M. (1997). Differential colocalization of profilin with microfilaments in PtK2 cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 37, 166-177.

- McCrea, P. D., and Gumbiner, B. M. (1991). Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J Biol Chem* 266, 4514-4520.
- McLaughlin, P. J., and Weeds, A. G. (1995). Actin-binding protein complexes at atomic resolution. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 24, 643-675.
- Mendel, R. R. (1997). Molybdenum cofactor of higher plants: biosynthesis and molecular biology. *Planta* 203, 399-405.
- Miki, H., Suetsugu, S., and Takenawa, T. (1998). WAVE, a novel WASP-family protein involved in actin reorganization induced by Rac. *Embo J* 17, 6932-6941.
- Minehardt, T. J., Kollman, P. A., Cooke, R., and Pate, E. (2006). The open nucleotide pocket of the profilin/actin x-ray structure is unstable and closes in the absence of profilin. *Biophys J* 90, 2445-2449.
- Mullins, R. D., and Pollard, T. D. (1999). Structure and function of the Arp2/3 complex. *Curr Opin Struct Biol* 9, 244-249.
- Mullins, R. D., Kelleher, J. F., Xu, J., and Pollard, T. D. (1998). Arp2/3 complex from *Acanthamoeba* binds profilin and cross-links actin filaments. *Mol Biol Cell* 9, 841-852.
- Nachmias, J. (1993). Masked detection of gratings: the standard model revisited. *Vision Res* 33, 1359-1365.
- Neuhoff, H., Sassoe-Pognetto, M., Panzanelli, P., Maas, C., Witke, W., and Kneussel, M. (2005). The actin-binding protein profilin I is localized at synaptic sites in an activity-regulated manner. *Eur J Neurosci* 21, 15-25.
- Nicolson, G. L. (1982). Cancer metastasis. Organ colonization and the cell-surface properties of malignant cells. *Biochim Biophys Acta* 695, 113-176.
- Nodelman, I. M., Bowman, G. D., Lindberg, U., and Schutt, C. E. (1999). X-ray structure determination of human profilin II: A comparative structural analysis of human profilins. *J Mol Biol* 294, 1271-1285.
- Nyman, T., Page, R., Schutt, C. E., Karlsson, R., and Lindberg, U. (2002). A cross-linked profilin-actin heterodimer interferes with elongation at the fast-growing end of F-actin. *J Biol Chem* 277, 15828-15833.
- Obermann, H., Raabe, I., Balvers, M., Brunswig, B., Schulze, W., and Kirchhoff, C. (2005). Novel testis-expressed profilin IV associated with acrosome biogenesis and spermatid elongation. *Mol Hum Reprod* 11, 53-64.
- Pantaloni, D., and Carlier, M. F. (1993). How profilin promotes actin filament assembly in the presence of thymosin beta 4. *Cell* 75, 1007-1014.
- Parish, R. W., Schmidhauser, C., Schmidt, T., and Dudler, R. K. (1987). Mechanisms of tumour cell metastasis. *J Cell Sci Suppl* 8, 181-197.

- Pawlak, G., and Helfman, D. M. (2001). Cytoskeletal changes in cell transformation and tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev* 11, 41-47.
- Perelroizen, I., Carlier, M. F., and Pantaloni, D. (1995). Binding of divalent cation and nucleotide to G-actin in the presence of profilin. *J Biol Chem* 270, 1501-1508.
- Pfaffl, M. W. (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res* 29, e45.
- Pollard, T. D., and Borisy, G. G. (2003). Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 112, 453-465.
- Porter, A. (1998). Controlling your losses: conditional gene silencing in mammals. *Trends Genet* 14, 73-79.
- Price, J. T., Bonovich, M. T., and Kohn, E. C. (1997). The biochemistry of cancer dissemination. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 32, 175-253.
- Pring, M., Weber, A., and Bubb, M. R. (1992). Profilin-actin complexes directly elongate actin filaments at the barbed end. *Biochemistry* 31, 1827-1836.
- Qian, C., Zhang, Q., Wang, X., Zeng, L., Farooq, A., and Zhou, M. M. (2005). Structure of the adaptor protein p14 reveals a profilin-like fold with distinct function. *J Mol Biol* 347, 309-321.
- Raghunathan, V., Mowery, P., Rozycki, M., Lindberg, U., and Schutt, C. (1992). Structural changes in profilin accompany its binding to phosphatidylinositol, 4,5-bisphosphate. *FEBS Lett* 297, 46-50.
- Rajagopalan, K. V., and Johnson, J. L. (1992). The pterin molybdenum cofactors. *J Biol Chem* 267, 10199-10202.
- Reddig, P. J., and Juliano, R. L. (2005). Clinging to life: cell to matrix adhesion and cell survival. *Cancer Metastasis Rev* 24, 425-439.
- Reinhard, M., Giehl, K., Abel, K., Haffner, C., Jarchau, T., Hoppe, V., Jockusch, B. M., and Walter, U. (1995). The proline-rich focal adhesion and microfilament protein VASP is a ligand for profilins. *Embo J* 14, 1583-1589.
- Rodriguez Fernandez, J. L., Geiger, B., Salomon, D., Sabanay, I., Zoller, M., and Ben-Ze'ev, A. (1992). Suppression of tumorigenicity in transformed cells after transfection with vinculin cDNA. *J Cell Biol* 119, 427-438.
- Rothkegel, M., Mayboroda, O., Rohde, M., Wucherpennig, C., Valenta, R., and Jockusch, B. M. (1996). Plant and animal profilins are functionally equivalent and stabilize microfilaments in living animal cells. *J Cell Sci* 109, 83-90.
- Roy, P., and Jacobson, K. (2004). Overexpression of profilin reduces the migration of invasive breast cancer cells. *Cell Motil Cytoskeleton* 57, 84-95.
- Rüdiger, M., Jockusch, B. M., and Rothkegel, M. (1997). Epitope tag-antibody combination useful for the detection of protein expression in prokaryotic and eukaryotic cells. *Biotechniques* 23, 96-97.

- Safer, D., Elzinga, M., and Nachmias, V. T. (1991). Thymosin beta 4 and Fx, an actin-sequestering peptide, are indistinguishable. *J Biol Chem* 266, 4029-4032.
- Sakisaka, T., Itoh, T., Miura, K., and Takenawa, T. (1997). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate phosphatase regulates the rearrangement of actin filaments. *Mol Cell Biol* 17, 3841-3849.
- Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A. R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463-5467.
- Schlüter, K., Jockusch, B. M., and Rothkegel, M. (1997). Profilins as regulators of actin dynamics. *Biochim Biophys Acta* 1359, 97-109.
- Schlüter, K., Zeuschner, D., Winkler, J., Pope, B., Weeds, A., and Jockusch, B. M. (1998). An alpha-actinin-profilin chimaera with two alternatively operating actin-binding sites. *Eur J Cell Biol* 76, 1-8.
- Schmitt, B., Knaus, P., Becker, C. M., and Betz, H. (1987). The Mr 93,000 polypeptide of the postsynaptic glycine receptor complex is a peripheral membrane protein. *Biochemistry* 26, 805-811.
- Schutt, C. E., Myslik, J. C., Rozycki, M. D., Goonesekere, N. C., and Lindberg, U. (1993). The structure of crystalline profilin-beta-actin. *Nature* 365, 810-816.
- Schwarz, G., Schulze, J., Bittner, F., Eilers, T., Kuper, J., Bollmann, G., Nerlich, A., Brinkmann, H., and Mendel, R. R. (2000). The molybdenum cofactor biosynthetic protein Cnx1 complements molybdate-repairable mutants, transfers molybdenum to the metal binding pterin, and is associated with the cytoskeleton. *Plant Cell* 12, 2455-2472.
- Sechi, A. S., and Wehland, J. (2000). The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci* 113 Pt 21, 3685-3695.
- Selden, L. A., Kinoshita, H. J., Estes, J. E., and Gershman, L. C. (1999). Impact of profilin on actin-bound nucleotide exchange and actin polymerization dynamics. *Biochemistry* 38, 2769-2778.
- Shapland, C., Lowings, P., and Lawson, D. (1988). Identification of new actin-associated polypeptides that are modified by viral transformation and changes in cell shape. *J Cell Biol* 107, 153-161.
- Shibasaki, Y., Ishihara, H., Kizuki, N., Asano, T., Oka, Y., and Yazaki, Y. (1997). Massive actin polymerization induced by phosphatidylinositol-4-phosphate 5-kinase in vivo. *J Biol Chem* 272, 7578-7581.
- Skare, P., and Karlsson, R. (2002). Evidence for two interaction regions for phosphatidylinositol(4,5)-bisphosphate on mammalian profilin I. *FEBS Lett* 522, 119-124.
- Sohn, R. H., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1994). Profilin: at the crossroads of signal transduction and the actin cytoskeleton. *Bioessays* 16, 465-472.

- Sohn, R. H., Chen, J., Koblan, K. S., Bray, P. F., and Goldschmidt-Clermont, P. J. (1995). Localization of a binding site for phosphatidylinositol 4,5- bisphosphate on human profilin. *J Biol Chem* 270, 21114-21120.
- Soule, H. D., Maloney, T. M., Wolman, S. R., Peterson, W. D., Jr., Brenz, R., McGrath, C. M., Russo, J., Pauley, R. J., Jones, R. F., and Brooks, S. C. (1990). Isolation and characterization of a spontaneously immortalized human breast epithelial cell line, MCF-10. *Cancer Res* 50, 6075-6086.
- Southwick, F. S., and Young, C. L. (1990). The actin released from profilin--actin complexes is insufficient to account for the increase in F-actin in chemoattractant-stimulated polymorphonuclear leukocytes. *J Cell Biol* 110, 1965-1973.
- Spagnou, S., Miller, A. D., and Keller, M. (2004). Lipidic carriers of siRNA: differences in the formulation, cellular uptake, and delivery with plasmid DNA. *Biochemistry* 43, 13348-13356.
- Steinhoff, C. (2001). Nutzung tumorspezifischer Veränderungen für die selektive Reexpression des Tumorsuppressorgens p53 in Harnblasenkarzinomen. Dissertation.
- Streuli, C. H., and Gilmore, A. P. (1999). Adhesion-mediated signaling in the regulation of mammary epithelial cell survival. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 4, 183-191.
- Studier, F. W., and Moffat, B. A. (1986). Use of the bacteriophage T7 RNA polymerase to direct selective high-level expression of cloned genes. *J Mol Biol* 189, 113-30.
- Stuven, T., Hartmann, E., and Gorlich, D. (2003). Exportin 6: a novel nuclear export receptor that is specific for profilin.actin complexes. *Embo J* 22, 5928-5940.
- Suetsugu, S., Miki, H., and Takenawa, T. (1998). The essential role of profilin in the assembly of actin for microspike formation. *Embo J* 17, 6516-6526.
- Sun, H. Q., Kwiatkowska, K., and Yin, H. L. (1995). Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol* 7, 102-110.
- Tall, E. G., Spector, I., Pentyala, S. N., Bitter, I., and Rebecchi, M. J. (2000). Dynamics of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in actin-rich structures. *Curr Biol* 10, 743-746.
- Tanaka, M., and Shibata, H. (1985). Poly(L-proline)-binding proteins from chick embryos are a profilin and a profilactin. *Eur J Biochem* 151, 291-297.
- Tessitore, L., Bonelli, G., Isidoro, C., Kazakova, O. V., and Baccino, F. M. (1986). Comparative studies on protein turnover regulations in tumor cells and host tissues: development and analysis of an experimental model. *Toxicol Pathol* 14, 451-456.
- Theile, M., Hartmann, S., Scherthan, H., Arnold, W., Deppert, W., Frege, R., Glaab, F., Haensch, W., and Scherneck, S. (1995). Suppression of tumorigenicity of breast cancer cells by transfer of human chromosome 17 does not require transferred BRCA1 and p53 genes. *Oncogene* 10, 439-447.
- Theriot, J. A., Rosenblatt, J., Portnoy, D. A., Goldschmidt-Clermont, P. J., and Mitchison, T. J. (1994). Involvement of profilin in the actin-based motility of *L. monocytogenes* in cells and in cell-free extracts. *Cell* 76, 505-517.



- Tilney, L. G., Bonder, E. M., Coluccio, L. M., and Mooseker, M. S. (1983). Actin from Thyone sperm assembles on only one end of an actin filament: a behavior regulated by profilin. *J Cell Biol* 97, 112-124.
- Tobacman, L. S., and Korn, E. D. (1982). The regulation of actin polymerization and the inhibition of monomeric actin ATPase activity by *Acanthamoeba* profilin. *J Biol Chem* 257, 4166-4170.
- Toker, A. (1998). The synthesis and cellular roles of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate. *Curr Opin Cell Biol* 10, 254-261.
- Vandekerckhove, J., Bauw, G., Vancompernelle, K., Honore, B., and Celis, J. (1990). Comparative two-dimensional gel analysis and microsequencing identifies gelsolin as one of the most prominent downregulated markers of transformed human fibroblast and epithelial cells. *J Cell Biol* 111, 95-102.
- Verheyen, E. M., and Cooley, L. (1994). Profilin mutations disrupt multiple actin-dependent processes during *Drosophila* development. *Development* 120, 717-728.
- Vollmann, A. (2004). Untersuchungen zum Einsatz von *small interfering RNAs* gegen *epidermal growth factor receptor* in humanen Gliomazellen. Dissertation.
- Watanabe, N., Madaule, P., Reidl, T., Ishizaki, T., Watanabe, G., Kakizuka, A., Saito, Y., Jockusch, B. M., and Narumiya, S. (1997). p140mDia, a mammalian homologue of *Drosophila* diaphanous, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J* 16, 3044-3056.
- White, S. R., Williams, P., Wojcik, K. R., Sun, S., Hiemstra, P. S., Rabe, K. F., and Dorscheid, D. R. (2001). Initiation of apoptosis by actin cytoskeletal derangement in human airway epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* 24, 282-294.
- White, T. E., di Sant'Agnese, P. A., and Miller, R. K. (1990). Human endometrial cells grown on an extracellular matrix form simple columnar epithelia and glands. *In Vitro Cell Dev Biol* 26, 636-642.
- Witke, W. (2004). The role of profilin complexes in cell motility and other cellular processes. *Trends Cell Biol* 14, 461-469.
- Witke, W., Podtelejnikov, A. V., Di Nardo, A., Sutherland, J. D., Gurniak, C. B., Dotti, C., and Mann, M. (1998). In mouse brain profilin I and profilin II associate with regulators of the endocytic pathway and actin assembly. *Embo J* 17, 967-976.
- Witke, W., Sutherland, J. D., Sharpe, A., Arai, M., and Kwiatkowski, D. J. (2001). Profilin I is essential for cell survival and cell division in early mouse development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 3832-3836.
- Wittenmayer, N. (2003). Funktionelle Charakterisierung des Cytoskelettproteins Profilin als Tumorsuppressor. Dissertation.
- Wittenmayer, N., Jandrig, B., Rothkegel, M., Schlüter, K., Arnold, W., Haensch, W., Scherneck, S., and Jockusch, B. M. (2004). Tumor suppressor activity of profilin requires a functional actin binding site. *Mol Biol Cell* 15, 1600-1608.

- Wolven, A. K., Belmont, L. D., Mahoney, N. M., Almo, S. C., and Drubin, D. G. (2000). In vivo importance of actin nucleotide exchange catalyzed by profilin. *J Cell Biol* 150, 895-904.
- Yamamoto, M., Hilgemann, D. H., Feng, S., Bito, H., Ishihara, H., Shibasaki, Y., and Yin, H. L. (2001). Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate induces actin stress-fiber formation and inhibits membrane ruffling in CV1 cells. *J Cell Biol* 152, 867-876.
- Yao, J., Le, T. C., Kos, C. H., Henderson, J. M., Allen, P. G., Denker, B. M., and Pollak, M. R. (2004). Alpha-actinin-4-mediated FSGS: an inherited kidney disease caused by an aggregated and rapidly degraded cytoskeletal protein. *PLoS Biol* 2, e167.
- Yokota, J. (2000). Tumor progression and metastasis. *Carcinogenesis* 21, 497-503.
- Yonezawa, N., Homma, Y., Yahara, I., Sakai, H., and Nishida, E. (1991). A short sequence responsible for both phosphoinositide binding and actin binding activities of cofilin. *J Biol Chem* 266, 17218-17221.

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bei Frau Prof. Dr. Brigitte M. Jockusch für die Möglichkeit bedanken, an diesem interessanten Thema arbeiten zu können, sowie für Ihre fachliche und persönliche Unterstützung im Laufe der letzten Jahre.

Bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Wehland möchte ich mich für die freundliche Übernahme des Koreferats bedanken. Für die Teilnahme an der Prüfungskommission gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. Ralf R. Mendel.

Herrn Dr. Martin Rothkegel danke ich insbesondere für die intensive Betreuung, die stete Hilfsbereitschaft und die Unterstützung bei der praktischen Arbeit. Für die zahlreichen wissenschaftlichen Anregungen und Diskussionen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben, bedanke ich mich ebenfalls.

Für die Finanzierung dieser Arbeit danke ich der Deutschen Krebshilfe/Dr. Mildred-Scheel-Stiftung für Krebsforschung.

Sabine Buchmeier gilt mein Dank für die Tipps rund um die Antikörper und für Ihre stetige Unterstützung.

Besonders bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern des Labors 184 für das angenehme Arbeitsklima und die freundliche und nette Unterstützung. Besonderer Dank gebührt Marén Siemon und Tina Geisler, die mir manches abgenommen haben und Carmen Wucherpfennig, Kai Murk und Guido Herzberg, die mich immer bei Laune gehalten haben.

Weiterhin bedanke ich mich bei Sascha Swiniarski, der zu der angenehmen Arbeitsatmosphäre beigetragen hat.

Besonders möchte ich mich bei den ehemaligen Mitarbeitern Dr. Diana Fleckenstein, Dr. Nina Wittenmayer, Dr. Berenike Henneberg, Dr. Björg Pauling und Dr. Anke Zieseniß bedanken, die beim Einstieg in die AG Jockusch viel geholfen haben.

Bei den langen Stunden an der Bank im Zelllabor konnte ich mich immer auf die Hilfe und Gesellschaft von Eva Saxinger und Tania Messerschmidt verlassen.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Familie. Ohne die praktische Hilfe, große Geduld und den enormen Zuspruch meines Mannes Robert hätte ich nicht die Kraft besessen, diese Zeit durchzustehen. Walter und Dorotea, vielen Dank auch an Euch. Eure unbegrenzte Liebe hat mir unglaublich geholfen!